



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12P 21/08, C12N 15/06, 15/09, 15/139,</b> <b>15/63, 15/85, 5/20, C07K 16/28, 14/715,</b> <b>G01N 33/577, 33/53, A61K 39/00, 39/395 //</b> <b>(C12P 21/08, C12R 1:91)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <div style="text-align: right;"><b>WO97/10354</b></div> <b>(43) 国際公開日</b> <div style="text-align: right;">1997年3月20日(20.03.97)</div>
<b>(21) 国際出願番号</b> <div style="text-align: right;">PCT/JP96/02588</div> <b>(22) 国際出願日</b> <div style="text-align: right;">1996年9月11日(11.09.96)</div> <b>(30) 優先権データ</b> 特願平7/232384                      1995年9月11日(11.09.95)                      JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 協和発酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 小池正道(KOIKE, Masamichi)[JP/JP] 〒194 東京都町田市中町3-9-13 Tokyo, (JP) 古谷安希子(FURUYA, Akiko)[JP/JP] 〒194 東京都町田市木曽町1464-49 Tokyo, (JP) 中村和靖(NAKAMURA, Kazuyasu)[JP/JP] 〒194 東京都町田市本町田1411-10 Tokyo, (JP) 飯田章博(IIDA, Akihiro)[JP/JP] 〒194 東京都町田市中町3-9-9 Tokyo, (JP)	穴澤秀治(ANAZAWA, Hideharu)[JP/JP] 〒178 東京都練馬区南大泉4-19-18 Tokyo, (JP) 花井陳雄(HANAI, Nobuo)[JP/JP] 〒229 神奈川県相模原市大野台7-9-15 Kanagawa, (JP) 高津聖志(TAKATSU, Kiyoshi)[JP/JP] 〒113 東京都文京区本郷4-20-1-407 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title:    ANTIBODY AGAINST <math>\alpha</math>-CHAIN OF HUMAN INTERLEUKIN 5 RECEPTOR</b>  <b>(54)発明の名称    ヒトインターロイキン5受容体 <math>\alpha</math> 鎖に対する抗体</b>  <b>(57) Abstract</b> A monoclonal antibody binding specifically to the $\alpha$ -chain of a human interleukin 5 receptor; a humanized antibody; a hybridoma and a transformant producing the antibody; a method for immunologically detecting the monoclonal antibody, the humanized antibody and, further, the $\alpha$ -chain of a human interleukin 5 receptor by using these antibodies; and a method for diagnosing and treating chronic bronchitis, etc. by using the monoclonal antibody and the humanized antibody.		

(57) 要約

ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖に特異的に結合するモノクローナル抗体およびヒト化抗体ならびに該抗体を生産するハイブリドーマおよび形質転換株、ならびに該モノクローナル抗体および該ヒト化抗体、さらに、これらを用いた、インターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖を免疫学的に検出する方法、ならびに該モノクローナル抗体およびヒト化抗体を用いる慢性気管支喘息等の診断および治療方法を提供する。本発明は、慢性気管支喘息などの疾患の診断あるいは治療に有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BH	バーレーン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	GU	グアテマラ	ML	マリ	TG	トーゴ
BM	バハマ	HN	ホンジュラス	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
BN	ブルネイ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CH	スイス	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KG	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	US	米国
CM	カメルーン	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	LK	スリランカ	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖に対する抗体技 術 分 野

本発明は、慢性気管支喘息などの疾患の診断あるいは治療に有用であるヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖に特異的に結合するモノクローナル抗体およびヒト化抗体ならびに該抗体を生産するハイブリドーマおよび形質転換株、ならびに該モノクローナル抗体および該ヒト化抗体を用いてインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖を免疫学的に検出する方法、ならびに該モノクローナル抗体およびヒト化抗体を用いる慢性気管支喘息等の診断および治療に関する。

背 景 技 術

インターロイキン-5 (以下、IL-5 と称す) は、T細胞や肥満細胞などにより分泌されるリンホカインの一種である。マウスにおける IL-5 は、B細胞の分化および増殖因子、好酸球の分化および増殖因子として作用することが知られている。ヒトにおいては、主として好酸球の分化および増殖因子として作用することが知られている [アドバンシーズ・イン・イムノロジー (Advances in Immunology), 57, 145 (1994)、ブラッド (Blood), 79, 3101 (1992)]。IL-5 は好酸球などの細胞表面上に発現されている特異的な受容体 (IL-5 受容体) を介してその作用を発現する。IL-5 受容体 (以下、IL-5R と称す) はヒト、マウスともに2種類の異なる蛋白質 [ $\alpha$ 鎖 (以下、IL-5R  $\alpha$  と称す)、 $\beta$ 鎖 (以下、IL-5R  $\beta$  と称す)] により構成されることが明らかにされている。さらに、IL-5 の IL-5R への結合は IL-5R  $\alpha$  によって担われており、IL-5R  $\beta$  はそれ自体では IL-5 に対する結合能を示さないことが知られている [EMBO・ジャーナル (EMBO J.), 9, 4367 (1990)、同、10, 2833 (1991)、ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン (J. Exp. Med.), 177, 1523 (1993)、同、175, 341 (1992)、セル (Cell), 66, 1175 (1991)、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), 89, 7041 (1992)]。また、IL-5R  $\beta$  はインターロイキン-3 (以下、IL-3 と称す) および顆粒球マクロ

ファージコロニー刺激因子(以下、GM-CSF と称す)などの受容体の構成成分であることが知られている [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 87, 9655(1990)、セル(Cell), 66, 1165(1991)]。

好酸球は慢性気管支喘息をはじめとするアレルギー性疾患において増加することが知られている。慢性気管支喘息患者の気道には好酸球の著しい浸潤が認められること、好酸球自身が細胞傷害性を有する顆粒蛋白を含み、その蛋白の沈着が慢性気管支喘息患者の気道組織あるいはアトピー性皮膚炎患者の病変部位に認められることなどから好酸球は慢性気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の病態形成において重要な働きをしているものと考えられ [アドバンシーズ・イン・イムノロジー(Adv. Immunol.), 39, 177(1986)、イムノロジー・トゥデイ(Immunol. Today), 13, 501(1992)]、その動態を把握することは臨床診断上有用である。一方、IL-5 はヒトにおいては好酸球に対して特異的に作用することから、IL-5R は好酸球に特異的に発現されているものと考えられ、IL-5R はヒト好酸球特異的なマーカーとして利用することができる。さらに、IL-5R  $\beta$  は IL-3、GM-CSF 等のサイトカイン受容体であることから、IL-5R  $\alpha$  が好酸球特異的なマーカーであると考えられる。従って、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖抗体 (以下、hIL-5R  $\alpha$  抗体と称す) を用いた免疫細胞染色などにより、特異的に好酸球を検出することができる。しかし、現在特異的に好酸球を検出することが可能な抗 h IL-5R  $\alpha$  抗体は知られていない。

一方、実際に生体内において好酸球の増多、浸潤に IL-5 が重要な働きをしていることは、IL-5 遺伝子導入マウスにおいて著しい好酸球増多が認められること [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン(J. Exp. Med.), 172, 1425(1990)、同, 173, 429(1991)、インターナショナル・イムノロジー(Int. Immunol.), 2, 965(1990)]、喘息モデル動物における好酸球の組織浸潤が抗 IL-5 抗体の投与により抑制されること [アメリカン・レビュー・オブ・レスピレイトリー・ディゼイズ(Am. Rev. Respir. Dis.), 147, 548(1993)、同, 148, 1623(1993)] などから明らかにされている。また、ヒト慢性気管支喘息患者の

気道粘膜組織、アトピー性皮膚炎患者の病変部位において、IL-5 の発現が認められることも報告されている [ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (J. Clin. Invest.), 87, 1541 (1991)、ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 173, 775 (1991)]。さらに、IL-5 はヒト好酸球に対して試験管内での寿命延長作用を示すこと [ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 143, 2311 (1989)]、好酸球選択的な活性化因子であること [ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 167, 219 (1988)] などが明らかにされている。

以上のことから、IL-5R に結合し、IL-5 の生物活性を阻害できる抗体は好酸球の活性を抑制し、慢性気管支喘息などのアレルギー性疾患の治療に有用であることが期待される。IL-5 の生物活性を阻害できる抗マウス IL-5R  $\alpha$  抗体 [特開平 3-108497、インターナショナル・イムノロジー (Int. Immunol.), 2, 181 (1990)] は、マウス IL-5R をその細胞表面に多数発現している IL-5 依存性細胞を抗原として用いることにより作製されている。一方、ヒトの場合、IL-5R を多数発現している細胞は知られておらず、好酸球においてもその発現は極めて低いことが報告されている [セルラー・イムノロジー (Cell. Immunol.), 133, 484 (1991)]。このため、抗マウス IL-5R  $\alpha$  抗体の作製と同様の方法により、同等の機能を有する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  抗体を得ることは困難である。EMBO・ジャーナル [EMBO J., 14, 3395 (1995)] には、ヒト IL-5R  $\alpha$  に対する抗体として  $\alpha$  16 と称する抗体の記載があるが、これは IL-5R  $\alpha$  に対する中和活性がないものである。

一方、ヒト IL-5R  $\alpha$  の遺伝子はヒト好酸球 [ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 175, 341 (1992)]、あるいはヒト前骨髄球系細胞 (HL60) [セル (Cell), 66, 1175 (1991)、特開平 6-78772] より調製した cDNA ライブラリーをマウス IL-5R  $\alpha$  の cDNA あるいはマウス IL-5R  $\alpha$  の部分アミノ酸配列 [特開平 6-54690、EMBO・ジャーナル (EMBO J.), 9, 4367 (1990)] を基に合成したオリゴ DNA をプローブとしてスクリーニングすることにより得られている。この cDNA を宿主細胞に導入することにより、細胞表

面に hIL-5R  $\alpha$  を発現した細胞が造成されているが、この細胞における hIL-5R の発現レベルは一細胞あたり  $10^4$  分子以下と極めて少ない [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 177, 1523 (1993)]。従って、この細胞を免疫原として用いて、抗 hIL-5R  $\alpha$  抗体を作製した場合、宿主細胞由来の蛋白質に比較して、hIL-5R  $\alpha$  の相対的な量は極めて少なく、また、絶対的な蛋白量としても極めて少ないことは明らかである。また、マウス IL-5R  $\alpha$  とヒト IL-5R  $\alpha$  の間にはアミノ酸レベルで 80% 近いホモロジーが認められること、マウス IL-5 がヒト IL-5R に対しても高い結合活性を示すこと [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 175, 341 (1992)] などから、被免疫動物として一般的に利用されるマウスやラットに対して、ヒト IL-5R  $\alpha$  は免疫原性が低いと考えられる。実際、hIL-5R  $\alpha$  発現細胞を免疫原として抗 hIL-5R  $\alpha$  抗体を作製を行ったが、困難であった。

ヒト好酸球の cDNA ライブラリーからの IL-5R  $\alpha$  cDNA のクローニングにおいて、IL-5R  $\alpha$  の膜貫通領域以下を欠く N 末端アミノ酸配列 1 ~ 313 番目に相当する可溶性ヒト IL-5R  $\alpha$  (以下、shIL-5R  $\alpha$  と称す) をコードする cDNA が得られている [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 175, 341 (1992)]。shIL-5R  $\alpha$  を免疫原として用いて、抗 hIL-5R  $\alpha$  抗体を作製した場合、IL-5 の生物活性を阻害できる抗 hIL-5R  $\alpha$  抗体を取得するためには、細胞表面に発現している IL-5R  $\alpha$  と同様な高次構造を保持している、真核性宿主細胞より分泌生産された shIL-5R  $\alpha$  を免疫原として用いることが必要である。また、同一蛋白においてもそのシグナルペプチドにより生産効率が著しく異なることが明らかにされていることから [蛋白質核酸酵素, 35, 2584 (1990)]、分泌生産を行うにあたり、適切なシグナルペプチドを選択する必要がある。

先に述べたように shIL-5R  $\alpha$  のみをコードするものと考えられている mRNA が好酸球で発現されていることが明らかにされている。マウスにおいては IL-5R は、好酸球のみならず B 細胞などにおいても発現されており、かつヒトの場合と同様に、それらの細胞において IL-5R  $\alpha$  の細胞外領域 (以下、smIL-5R  $\alpha$  と称す) のみをコードするものと考えられている mRNA の発現が確認されている。

また、IL-5R を発現しているマウス慢性B細胞白血病株(BCL1)を移植されたマウス、あるいは、ヒト自己免疫疾患のモデルマウスの血液中に smIL-5R  $\alpha$ が検出されることも報告されている [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド (J. Immunol. Method), 167, 289 (1994)]。これらのことは、IL-5R を発現している細胞の増多、活性化状態が血液中に分泌されている smIL-5R  $\alpha$ の量に反映される可能性を示唆している。ヒトの場合、IL-5R は好酸球に限られた発現をするものと考えられており、好酸球の増多、活性化が血液中などの shIL-5R  $\alpha$ の量に反映される可能性がある。従って、shIL-5R  $\alpha$ の定量を可能にすることは、臨床診断上有用と期待される。

以上のことから、ヒト IL-5R  $\alpha$ に特異的に結合するモノクローナル抗体が取得できればアレルギー性疾患の診断、治療に有用であると考えられるが、一般にヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることによりヒト体内にヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体ができてしまう。その結果、投与されたヒト以外の動物抗体と反応し、副作用を引き起こしたり [ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.), 2, 881 (1984)、ブラッド (Blood), 65, 1349 (1985)、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート (J. Natl. Cancer Inst.), 80, 932 (1988)、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), 82, 1242 (1985)]、抗体がはやくクリアランスされたり [ジャーナル・オブ・ニュークlear・メディシン (J. Nucl. Med.), 26, 1011 (1985)、ブラッド (Blood), 65, 1349 (1985)、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート (J. Natl. Cancer Inst.), 80, 937 (1988)]、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている [ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 135, 1530 (1985)、キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 46, 6489 (1986)]。

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体をヒト型キメラ抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体 (再形成ヒト抗体) のようなヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型

キメラ抗体は、抗体可変領域（以下、V領域と称す）がヒト以外の動物抗体由来で定常領域（以下、C領域と称す）がヒト抗体由来である抗体であり〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) , 81, 6851 (1984) 〕、ヒトに投与した場合、ヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体はほとんど惹起されず、血中半減期が6倍のびることが報告されている〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) , 86, 4220 (1989) 〕。ヒト型 CDR 移植抗体はヒト抗体の CDR [相補性決定領域; Complementarity Determining Region] をヒト以外の動物由来の抗体の CDR と置換した抗体であり〔ネイチャー (Nature) , 321, 522 (1986) 〕、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が4~5倍伸びることが報告されている〔ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) , 147, 1352 (1991) 〕。しかしながら、これまでのところ hIL-5R  $\alpha$  に対するヒト化抗体は報告されていない。

従って、ヒト IL-5R  $\alpha$  に対して特異的に結合するヒト化抗体は、ヒト体内に投与したときにヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体が生じないことによる、副作用の減少、および血中半減期の延長により、慢性気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患等に対する高い治療効果が期待される。

さらに、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、一本鎖抗体〔サイエンス (Science) , 242, 423 (1988) 〕あるいはジスルフィド安定化抗体〔モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunology) , 32, 249 (1995) 〕といった、より小さな抗体分子の作製が行われている。一本鎖抗体やジスルフィド安定化抗体はモノクローナル抗体あるいはヒト化抗体に比べ、その分子量が小さいことから組織移行性、血中からのクリアランスに優れ、イメージング等への応用、さらにはトキシンとの複合体の作製も行われ、治療効果も期待されている〔キャンサー・リサーチ (Cancer Research) , 55, 318 (1995) 〕。ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖特異的に結合する一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体ができれば、アレルギー



ギー疾患等に対する高い診断、治療効果が期待される。しかしながら、ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体についてもこれまでのところ報告されていない。

### 発 明 の 開 示

本発明者らは、ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖の膜貫通領域以下を欠いた細胞外領域に相当する、N末端アミノ酸 1 ～313 番目に存在するエピトープを認識する hIL-5R  $\alpha$  鎖に対する抗体が、免疫細胞染色によりヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖に特異的に反応すること、およびヒトインターロイキン 5 の生物活性を抑制することができることを見出した。これらの抗体を用いれば、前記アレルギー性疾患の診断、治療を行うことができる。

したがって、本発明は、ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に特異的に反応する抗体を提供する。本発明における抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体などを含む。本発明におけるモノクローナル抗体は、hIL-5R  $\alpha$  鎖に特異的に反応するものであればいかなるものでもよいが、以下に述べる製造法によって確立したものが好適なものとしてあげられる。すなわち、hIL-5R  $\alpha$  タンパクを抗原として調製し、それらをマウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能な動物に免疫することにより、抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髓腫細胞株とを融合させ、モノクローナル抗体産生能を有したハイブリドーマを調製し、これを培養することにより、抗 IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体を取得できる。本発明のモノクローナル抗体としては、ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖の N末端アミノ酸から 1 ～313 番目に存在するエピトープを認識し、かつ免疫組織染色によりヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に特異的に反応するモノクローナル抗体、およびヒト IL-5R  $\alpha$  鎖の N末端アミノ酸から 1 ～313 番目に存在するエピトープを認識し、かつ IL-5 の生物活性を抑制するモノクローナル抗体であれば、いずれも用いることができる。前者に属するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマ株 KM1257 (FERM BP-5133) が生産するモノクローナル抗体 KM1257、後者に属するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマ株 KM1259 (FERM BP-5134) が生産するモノクローナル抗体 KM125

9およびハイブリドーマ株KM1486 (FERM BP-5651) が生産するモノクローナル抗体KM1486が具体例としてあげられる。

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖、ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖を細胞表面に発現した細胞、ヒト好酸球などと免疫学的に反応する。また、本発明のモノクローナル抗体は、可溶性ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖と免疫学的に反応する。したがって、本発明は、ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖、ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖を細胞表面に発現した細胞、ヒト好酸球および可溶性ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖を免疫学的に検出、定量する方法も提供する。これらの検出、定量結果は、慢性気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の診断および治療に利用することができる。

さらに、本発明では、モノクローナル抗体以上に、副作用が少なく、血中半減期が延期され、より治療薬として望ましいIL-5の生物活性を阻害するヒト化抗体を提供する。本発明におけるヒト化抗体とは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体の総称である。

ヒト型キメラ抗体とは、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖（以下、VHと称す）および可変領域軽鎖（以下、VLと称す）とヒト抗体の定常領域重鎖（以下、CHと称す）およびヒト抗体の定常領域軽鎖（以下、CLと称す）とからなる抗体を意味し、ヒト型CDR移植抗体とは、ヒトの抗体のVHおよびVLのCDR配列をヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。IL-5の生物活性を阻害する抗h IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体は、ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖に反応し、IL-5の生物活性を阻害できる抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。本発明のヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体はいずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいがIgG型のものが好適であり、さらにIgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4といったイムノグロブリンのC領域のいずれも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体の例としては、抗体のVHが配列番号24記載のアミ

ノ酸配列を含み、CHがヒト抗体IgG1であり、抗体のVLが配列番号25記載のアミノ酸配列を含み、CLがヒト抗体 $\kappa$ である抗体があげられ、KM1399と称するものが具体例としてあげられる。また、CHがヒト抗体IgG4であるヒト型キメラ抗体としてはKM7399と称するものが具体例としてあげられる。KM1399を生産する形質転換株としてはKM1399 (FERM BP-5650) があげられる。KM7399を生産する形質転換株としてはKM7399 (FERM BP-5649) があげられる。

また、IL-5の生物活性を阻害する抗hIL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型CDR移植抗体は、ヒトIL-5R  $\alpha$  鎖 に反応し、IL-5の生物活性を阻害できるヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列をそれぞれ置換したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。本発明のヒト型CDR移植抗体の例としては、抗体のVHが配列番号72記載のアミノ酸配列を含み、CHがヒト抗体IgG1であり、抗体のVLが配列番号63記載のアミノ酸配列を含み、CLがヒト抗体 $\kappa$ である抗体があげられ、KM8399と称するものが具体例としてあげられる。また、CHがヒト抗体IgG4であるヒト型CDR移植抗体としてはKM9399と称するものが具体例としてあげられる。KM8399を生産する形質転換株としてはKM8399 (FERM BP-5648) があげられる。KM9399を生産する形質転換株としてはKM9399 (FERM BP-5647) があげられる。

本発明のヒト化抗体は、ヒトIL-5R  $\alpha$  鎖、ヒトIL-5R  $\alpha$  鎖を細胞表面に発現した細胞、ヒト好酸球などと免疫学的に反応する。したがって、本発明は、慢性気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の診断および治療に利用することができる。

さらに、本発明ではヒトIL-5R  $\alpha$  鎖に対して結合性を示す一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFvと称す)あるいはジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す)を提供する。

一本鎖抗体(scFv)とは、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリinker(以下、Lと称す)を用いて連結した、VH-L-VLないしはVL-L-VHポリペ

プチドを示す。本発明のscFvに含まれるVHおよびVLは抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のいずれをも用いることができる。

ジスルフィド安定化抗体 (dsFv) とはVHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 [プロテイン エンジニアリング (Protein Engineering), 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれるVHあるいはVLはマウス型抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のいずれをも用いることができる。

ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖に対して結合性を示す一本鎖抗体は、ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖に反応する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。本発明のモノクローナル抗体由来の一本鎖抗体の例としては、抗体のVHが配列番号24記載のアミノ酸配列を含み、VLが配列番号25記載のアミノ酸配列を含む抗体があげられる。本発明のヒト型CDR移植抗体由来の一本鎖抗体の例としては、抗体のVHが配列番号72記載のアミノ酸配列を含み、VLが配列番号63記載のアミノ酸配列を含む抗体があげられる。

ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖に対して結合性を示すジスルフィド安定化抗体は、ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖に反応する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。本発明のモノクローナル抗体由来の一本鎖抗体の例としては、抗体のVHが配列番号24記載のアミノ酸配列を含み、VLが配列番号25記載のアミノ酸配列を含む抗体があげられる。

本発明のヒト型CDR移植抗体由来のジスルフィド安定化抗体の例としては、抗体のVHが配列番号72記載のアミノ酸配列を含み、VLが配列番号63記載のアミノ酸

配列を含む抗体があげられる。

以下に、ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖に特異的に反応する、あるいはヒトIL-5の生物活性を阻害する抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体、ヒトIL-5の生物活性を阻害する抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖ヒト化抗体、抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖一本鎖抗体および抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖ジスルフィド安定化抗体の製造法、ならびに該抗体によるヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖の検出および定量法について、説明する。

## 1. 抗hIL-5R $\alpha$ モノクローナル抗体の作製

### (1) 抗原の調製

抗hIL-5R $\alpha$ モノクローナル抗体を作製するために必要な抗原としては、hIL-5R $\alpha$ を細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、hIL-5R $\alpha$ 発現細胞であるCTLL-2(h5 R)の細胞あるいはその細胞膜画分等を用いることができる。CTLL-2(h5 R)細胞は、既にクローニングされている完全長のhIL-5R $\alpha$ をコードするcDNA [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン(J. Exp. Med.), 175, 341(1992)] を動物細胞用発現ベクター、たとえばpCAGGS [ジーン(Gene), 108, 193 (1991)] に組み込み、エレクトロポレーション法 [特開平2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)] により該発現ベクターをマウスT細胞株であるCTLL-2に導入することにより造成されたhIL-5R $\alpha$ 発現細胞である。

また、hIL-5R $\alpha$ をコードするcDNAの全長もしくはその部分断片は、例えば、大腸菌などの原核性宿主細胞中で発現させるために、発現ベクター、たとえば市販のpGEX [ファルマシア(Pharmacia) 社]、pET システム [ノバジェン(Novagen) 社] あるいは実施例1の(11)で述べるpMKex1などに組み込み、hIL-5R $\alpha$ の全長または部分断片をそのままあるいは融合蛋白として発現させることができる。大腸菌により発現された蛋白質は、菌体を破碎した後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動または融合蛋白質の性質に応じたアフィニティークロマトグラフィーなどの方法により精製することができる。

IL-5R $\alpha$ の全長または部分断片をそのままあるいは融合蛋白として発現させる方法としては、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核性宿主細胞も用いることが

できる。

哺乳動物細胞の場合、例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリ(J. Biochem.), 101, 1307(1987)]、実施例1の(1)で述べるpAGE210等のベクター内にhIL-5R $\alpha$ をコードするcDNAの全長または部分断片を公知の方法を用いて組み込み、該蛋白質の発現ベクターを構築することができる。また、該cDNAがコードするhIL-5R $\alpha$ の全長または部分断片をそのままあるいは融合蛋白として効率的な発現を行うためには、該cDNA中のシグナルペプチドをコードする塩基配列と真核性宿主中で高発現させることができる蛋白質のシグナルペプチドをコードする塩基配列とを入れ換えることが好ましい。公知の蛋白質シグナルペプチドとしては、例えばヒト成長ホルモン、抗ガングリオシドGD3 キメラ抗体KM871 (特開平5-304989)などを用いることが好ましい。

このようにして構築した発現ベクターは宿主細胞にエレクトロポレーション法[特開平2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)]、リポフェクチン法[プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 84, 7413(1987)]などの公知の方法を用いて導入することができる。これらの細胞を適当な培地中で培養することにより、細胞内あるいは培養上清中にhIL-5R $\alpha$ の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白として生産することができる。培地としては、培養上清中に生産されたhIL-5R $\alpha$ の部分断片あるいはその融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

また、昆虫細胞の場合、ファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキットなどを用いて、hIL-5R $\alpha$ をコードするcDNAの全長または部分断片を組み込んだ組み換えバキュロウィルスを作製し、Sf9やSf21等の昆虫細胞(いずれもファーミンジェン社製)に該組み換えウィルスを感染させることにより、細胞内あるいは培養上清中にhIL-5R $\alpha$ の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白として、生産させることができる[バイオテクノロジー(Bio/Technology), 6, 47 (1988)]。

動物細胞または昆虫細胞などにより生産されたhIL-5R $\alpha$ の全長あるいは部分断片または融合蛋白は、既知の蛋白質精製方法、例えば塩析、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの方法に従って培養上清などから精製し、抗原として供することができる。とくに免疫グロブリンの定常領域との融合蛋白質として生産された場合は、免疫グロブリンの定常領域に対して特異的な親和性を有するプロテインAなどを固定化したアフィニティークラムを用いて精製することが好ましい。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよいが、本明細書中においては、マウスまたはラットを用いる例を説明する。3～20週令のマウスまたはラットに、shIL-5R $\alpha$ あるいはhIL-5R $\alpha$ を細胞表面に発現しているCTLL-2細胞〔ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.), 177, 1523(1993)〕を抗原として免疫し、その動物の脾、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント〔例えば、フロイン드의完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど〕とともに抗原を投与することにより行う。抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに5～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊 1976年〕などで調べる。

免疫に用いたshIL-5R $\alpha$ またはhIL-5R $\alpha$ を細胞表面に発現している細胞に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給原として供する。

脾細胞と骨髓腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3～7日目に、免疫したマウスより脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離(1,200rpm、5分)した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1～

2 分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で3 回洗浄して融合用脾細胞として提供する。

### (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから得られた株化細胞を使用する。たとえば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [カレント・トピックス・イン・ミクロバイオロジー・アンド・イムノロジー (Curr. Topics Microbiol. Immunol.), 81, 1 (1978)、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Europ. J. Immunol.), 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 (SP-2) [ネイチャー (Nature), 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8 (X63) [ネイチャー (Nature), 256, 495 (1975)] などが用いられる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640 培地にグルタミン (1.5mM)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$ M)、ジェンタマイシン (10  $\mu$ g/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン (15  $\mu$ g/ml) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3 ~4 日前に正常培地に継代し、融合当日  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

### (4) 細胞融合

前記 1 (2) で免疫した抗体産生細胞と 1 (3) で得られた骨髓腫細胞をMEM 培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1 リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞=5 ~10 : 1 になるよう混合し、遠心分離 (1,200rpm、5 分) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml の混液0.2 ~1ml/ $10^8$  抗体産生細胞を加え、1 ~2 分間毎にMEM 培地1 ~2ml を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が50mlになるようにする。遠心分離 (900rpm、5 分) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに細胞をHAT 培地 [正常培地に



ヒポキサンチン ( $10^{-4}\text{M}$ )、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ ) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}\text{M}$ ) を加えた培地] 100ml 中に懸濁する。

この懸濁液を96ウェル培養用プレートに100  $\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとり 1 (5) に述べる酵素免疫測定法により、前記 1 (1) で述べたshIL-5R  $\alpha$  またはhIL-5Rとの融合蛋白などの組み換え蛋白質に特異的に反応するウェルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し[1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものをマウスまたはラット抗hIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### (5) マウスまたはラット抗ヒトIL-5R $\alpha$ モノクローナル抗体の選択

マウスまたはラット抗hIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、アンチボディズ [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] に述べられている方法などに従い、以下に述べる測定法により行う。これらの方法により、後述する抗hIL-5R  $\alpha$  ヒト化抗体、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体を産生する形質転換株の培養上清中に含まれる抗hIL-5R  $\alpha$  抗体あるいはすべての精製抗hIL-5R  $\alpha$  抗体の活性を測定することもできる。

前記 1 (1) で述べたshIL-5R  $\alpha$  またはhIL-5R  $\alpha$  との融合蛋白などの組み換え蛋白質を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは 1 (6) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体もしくは抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、hIL-5R  $\alpha$  に特異的に反応するものをマウス抗hIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

抗hIL-5R  $\alpha$  ヒト化抗体、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体を産生する形質転換株の培養上清もしくはそれらの精製抗体を第一抗体として反応させ

た場合には、第二抗体としてはビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を用い、標識物質に応じた反応を行なうことにより検出を行う。

また、前記 1 (1) で述べた shIL-5R  $\alpha$  または hIL-5R  $\alpha$  との融合蛋白などの組み換え蛋白質を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清、抗 hIL-5R  $\alpha$  ヒト化抗体、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体を産生する形質転換株の培養上清、もしくははそれらの精製抗体のいずれかと、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したヒト IL-5 とを混合して反応させた後、標識物質に応じた反応を行うことにより、ヒト IL-5 のヒト IL-5R  $\alpha$  への結合阻害活性を測定することができる。この方法を用いてハイブリドーマのスクリーニングを行い、ヒト IL-5 阻害活性の高いものを選択する。

#### (6) マウスまたはラットモノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5ml を腹腔内投与し、2 週間飼育する] した 8 ~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、前記 1 (3) で得られたマウスまたはラット抗 hIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離 (3,000rpm, 5 分) して固形分を除去後、40~50% 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAE- セファロースカラム、プロテイン A- カラムあるいはセルロファイン GSL2000 (生化学工業社製) のカラムに通塔し、IgG あるいは IgM 画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは 280nm での吸光度より算出する。

## 2. 抗ヒト IL-5R $\alpha$ ヒト化抗体の作製

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発

現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のC領域であるCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。ヒト抗体のC領域としては、例えば、ヒト抗体H鎖ではC $\gamma$ 1やC $\gamma$ 4、ヒト抗体L鎖ではC $\kappa$ 等の任意のヒト抗体のC領域を用いることができる。ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体C領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.) 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR プロモーターとエンハンサー [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖、L鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

## (2) ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得する。

抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウス抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖抗体産生ハイブリドーマ等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のC領域部分あるいはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびVLをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

## (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記2(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にあらかじめヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングするための制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAを下記に述べる合成DNAを介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成DNAは、ヒト以外の動物の抗体のV領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のC領域の5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するようにDNA合成機を用いて製造する。

## (4) ヒト以外の動物の抗体のCDR配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域（以下、FR領域と称す）とそれらを連結する配列の変化に富

んだ3個の相補性決定領域（CDR）から成っている [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]。そして各CDRアミノ酸配列（CDR配列）は、既知の抗体のV領域のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより同定することができる。

#### (5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

まず、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRを移植するためのヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をVH、VLそれぞれについて選択する。ヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のV領域のFRのアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankに登録されているヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] があげられるが、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列と高い相同性を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をコードするDNA配列と目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRのアミノ酸配列をコードするDNA配列を連結させて、VH、VLそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。CDR移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計したDNA配列を得るためには、全DNA配列をカバーするように各鎖について数本の合成DNAを設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと称す) を行う。PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから各鎖について、好ましくは、6本の合成DNAを設計する。反応後、増幅断片を適当なベク

ターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型CDR移植抗体の各鎖のV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを取得する。また、約100塩基よりなる合成DNAを用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらをアニーリング、連結することで、目的のヒト型CDR移植抗体の各鎖のV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを構築することもできる。

#### (6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRのみをヒト抗体のV領域のFR間に、単純に移植しただけでは、その活性は基のヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている〔バイオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY) , 9, 266 (1991)〕。そこでヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に関与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、活性を上昇させることが行われている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X線結晶解析あるいはコンピューターモデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型CDR移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記2(5)に記載のPCRを行うことにより達成できる。PCR後の増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むベクター（以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す）を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20～35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA配列を含む20～35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行

う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

#### (7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

前記2(1)のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子上流に、前記2(5)および2(6)で取得したヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築するためのPCRの際に5'-及び3'-末端の合成DNAの末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体のC領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

#### (8) ヒト化抗体の一過性(トランジェント)発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクター、および前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクターあるいはそれらの改変ベクターをCOS-7細胞(ATCC CRL1651)に導入してヒト化抗体の一過性発現[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC Press, p. 283, 1991]を行い、その活性を測定することができる。

COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC Press, p. 283, 1991]、リボフェクション法[プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス[Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7413 (1987)]等があげられる。

ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記1(5)に記載の酵素免疫測定法(ELISA法)等により測定することができる。

#### (9) ヒト化抗体の安定(ステーブル)発現および活性評価

前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を

安定に生産する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法〔特開平2-257891、サイトテクノロジー (Cytotechnology) , 3, 133, (1990) 〕等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞 (ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下DHFR遺伝子と称す) が欠損したCHO細胞〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) , 77, 4216, (1980) 〕、ラットYB2/3 HL.P2.G11.16Ag.20細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と称す) 等があげられる。

ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418およびFCSを含むRPMI1640培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記1 (5) に記載の方法などにより測定する。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる〔アンチボディズ (Antibodies) , A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988〕。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 〔ネイチャー (Nature) , 227, 680, (1970) 〕やウエスタンブロッティング法〔アンチボディズ (Antibodies) , A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988〕等



で測定する。

精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体のIL-5に対する阻害活性の測定は前記1（5）に記載の方法などにより測定することができる。

#### （10）ヒト化抗体の使用法

本発明のヒト化抗体はヒトIL-5R $\alpha$ 鎖と特異的に結合し、IL-5の生物活性を阻害することができる。このため、本発明により提供されるヒト化抗体はIL-5により分化、増殖が制御されている好酸球の機能を阻害することが期待される。従って、好酸球が病態の形成に関与している疾患においてその治療等に有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内で免疫原性を示さず、その効果が長期間にわたり持続することが期待される。本発明のヒト化抗体は単独でまたは少なくとも1種以上の製剤上許容される補助剤と共に用いることができる。例えば、ヒト化抗体を、生理食塩水やグルコース、ラクトース、マンニトール等の水溶液に溶解して適当な医薬組成物とする。または、ヒト化抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を作製する。本医薬組成物は必要に応じ、製剤分野で周知の添加剤、例えば、製剤上許容される塩等を含むことができる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、ヒト化抗体を0.1～20mg/kg/日投与する。投与は、1日1回（単回投与または連日投与）または間歇的に1週間に1～3回、2、3週間に1回静脈注射により行う。

### 3. 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 一本鎖抗体の作製

#### （1）一本鎖抗体発現ベクターの構築

前記2（2）、2（5）および2（6）に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを一本鎖抗体発現ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型CDR移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用

いる一本鎖抗体発現用ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

選択された発現用ベクターに、VH-L-VL あるいは VL-L-VH (L はペプチドリンカー) からなる一本鎖抗体をコードする cDNA を適切なプロモーター、シグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の一本鎖抗体をコードする cDNA が挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。

一本鎖抗体をコードする cDNA は、VH をコードする cDNA と VL をコードする cDNA とを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリンカーをコードする合成 DNA を用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、その付加が VH、VL の抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えば Pantoliano らにより示されたもの [バイオケミストリー (Biochemistry), 30, 10117 (1991)] あるいはそれを改変したものを用いることができる。

## (2) 一本鎖抗体の発現および活性評価

前記 3 (1) で構築した一本鎖抗体発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平 2-257891、サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等の

方法により適切な宿主細胞へ導入することにより、目的の一本鎖抗体を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる一本鎖抗体の活性は前記 1 (5) に記載の方法等により測定することができる。

本発明の一本鎖抗体の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、一本鎖抗体が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラスマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒（インクルージョン・ボディー）として存在している一本鎖抗体は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心と洗浄を繰り返し、例えばグアニジン・塩酸による可溶化、および再度一本鎖抗体の活性を有する構造へと導く操作、それに続く活性分子の精製によって達成することができる。

そして、精製された一本鎖抗体の活性は前記 1 (5) に記載の方法等により測定することができる。

### (3) 一本鎖抗体の使用法

本発明の一本鎖抗体はヒト IL-5R  $\alpha$  鎖と特異的に結合し、IL-5 の生物活性を阻害することができる。このため、本発明により提供される一本鎖抗体は IL-5 により分化、増殖が制御されている好酸球の機能を阻害することが期待される。従って、好酸球が病態の形成に関与している疾患においてその治療等に有用であると考えられる。本発明の一本鎖抗体は単独でまたは少なくとも 1 種以上の製剤上許容される補助剤と共に用いることができる。例えば、一本鎖抗体を、生理食塩水やグルコース、ラクトース、マンニトール等の水溶液に溶解して適当な医薬組成物とする。または、一本鎖抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を作製する。本医薬組成物は

必要に応じ、製剤分野で周知の添加剤、例えば、製剤上許容される塩等を含有することができる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、一本鎖抗体を0.1～20mg/kg/日投与する。投与は、1日1回（単回投与または連日投与）または間歇的に1週間に1～3回、2、3週間に1回静脈注射により行う。

#### 4. 抗ヒトIL-5R $\alpha$ ジスルフィド安定化抗体の作製

##### (1) ジスルフィド安定化抗体の作製

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAあるいはヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAのそれぞれの適切な位置の1アミノ酸残基に相当するDNA配列をシステイン残基に相当するDNA配列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製することができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前記2(5)のPCRを用いた変異導入法により行うことができる。

得られた改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるためにジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なもの

を選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードするcDNAを発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

## (2) ジスルフィド安定化抗体の発現、活性評価

前記4(1)で構築されたジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターをエレクトロポレーション法〔特開平2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)〕等の方法により宿主細胞へ導入することにより、目的のジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれるジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の発現は前記1(5)に記載の方法等により確認することができる。

ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒(インクルージョン・ボディー)として存在しているジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。

そして、精製されたジスルフィド安定化抗体H鎖とジスルフィド安定化抗体L

鎖を混合し、活性を有する構造へと導く操作 [refolding操作, モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunology), 32, 249(1995)] によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記 1 (5) に記載の方法等により測定することができる。

### (3) ジスルフィド安定化抗体の使用法

本発明のジスルフィド安定化抗体はヒトIL-5R $\alpha$ 鎖と特異的に結合し、IL-5の生物活性を阻害することができる。このため、本発明により提供されるジスルフィド安定化抗体はIL-5により分化、増殖が制御されている好酸球の機能を阻害することが期待される。従って、好酸球が病態の形成に関与している疾患においてその治療等に有用であると考えられる。本発明のジスルフィド安定化抗体は単独でまたは少なくとも1種以上の製剤上許容される補助剤と共に用いることができる。例えば、一本鎖抗体またはジスルフィド安定化抗体を、生理食塩水やグルコース、ラクトース、マンニトール等の水溶液に溶解して適当な医薬組成物とする。または、ジスルフィド安定化抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を作製する。本医薬組成物は必要に応じ、製剤分野で周知の添加剤、例えば、製剤上許容される塩等を含むことができる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、ジスルフィド安定化抗体を0.1~20mg/kg/日投与する。投与は、1日1回(単回投与または連日投与)または間歇的に1週間に1~3回、2、3週間に1回静脈注射により行う。

## 5. 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 抗体を用いたヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖の検出および定量法

### (1) 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 抗体を用いた免疫細胞染色

浮遊細胞についてはそのまま、付着細胞についてはトリプシンEDTAにて細胞

をはがした後、免疫細胞染色用緩衝液（1%BSA、0.02%EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS）などに懸濁し、 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  個ずつに分注する。前記1(4)で得られた抗ヒトIL-5R  $\alpha$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清、前記2(9)で得られた抗ヒトIL-5R  $\alpha$ ヒト化抗体形質転換株の培養上清、あるいは前記1(6)もしくは2(9)で得られた精製抗体、または該精製抗体を公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊 1985年）でビオチンなどの適当な標識物質により標識したものを0.1～50  $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて希釈したものを20～500  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、氷冷下で30分間反応させる。前記1(4)で得られたマウス抗ヒトIL-5R  $\alpha$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清、前記2(9)で得られた抗ヒトIL-5R  $\alpha$ ヒト化抗体形質転換株あるいは前記1(6)もしくは前記2(9)で得られた精製抗体を反応させた場合、反応終了後免疫細胞染色用緩衝液で細胞を洗浄し、FITCあるいはフィコエリスリンなどの蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体、抗ラットイムノグロブリン抗体あるいは抗ヒトイムノグロブリン抗体を0.1～50  $\mu\text{g/ml}$ 程度の濃度を含む免疫細胞染色用緩衝液を50～500  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、氷冷下で30分間遮光して反応させる。また、ビオチン標識した該モノクローナル抗体を反応させた場合、FITCあるいはフィコエリスリンなどの蛍光色素で標識したストレプトアビジンを50～500  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、氷冷下で30分間遮光して反応させる。FITCあるいはフィコエリスリンなどの蛍光色素で標識した該モノクローナル抗体を反応させた場合、該モノクローナル抗体を0.1～50  $\mu\text{g/ml}$ 程度の濃度を含む免疫細胞染色用緩衝液を50～500  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、氷冷下で30分間遮光して反応させる。いずれの場合も、反応後はよく免疫細胞染色用緩衝液で洗浄し、セルソーターにより解析する。

## （2）抗ヒトIL-5R $\alpha$ 抗体を用いたヒトIL-5依存性細胞の増殖抑制試験

得られた抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 抗体の生物活性阻害作用を示すために、ヒトIL-5依存性細胞を用いて、その細胞増殖に対する影響を検討した。評価方法としては、トリチウム標識チミジンの細胞内への取り込み、あるいは、セルカウンティン

グキットを用いた発色法などが挙げられる。ここでは、本発明で用いた発色法について述べる。

CTLL-2 (h5R) 細胞  $1 \times 10^4$  個を  $50 \mu\text{l}$  の正常培地に懸濁して 96 ウェル培養用プレートに分注する。ここに前記 1 (6) もしくは 2 (9) で得られた  $0.01 \sim 50 \mu\text{g/ml}$  の精製抗体溶液  $25 \mu\text{l}$ 、さらに  $0.4 \sim 40 \text{ng/ml}$  のヒト IL-5 を含む正常培地を加えて  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、 $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  5% 気流下で 24~72 時間培養する。その後、セルカウティングキット溶液を  $10 \mu\text{l}$  / ウェルで加えてから  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  5% 気流下で 4 時間培養する。培養終了後、450nm の吸光度をマイクロウェルプレートリーダー Emax (モレキュラーデバイス社製) にて測定し、各抗体の CTLL-2 (h5R) 細胞増殖抑制活性を算出する。

### (3) 抗ヒト IL-5R $\alpha$ 抗体によるヒト好酸球の生存抑制

ポリモルフプレップ (polymorphprep、ニコメッド社製) あるいはパーコール (percoll、ファルマシア社製) などの市販の血球分離用媒体を用いてヒト末梢血中より好酸球を含むヒト多形核白血球画分を調製する。正常培地に懸濁し、96、48 あるいは 24 ウェル細胞培養用プレートに、得られた細胞を  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  個 / ウェル分注し、ヒト IL-5 を最終濃度が  $0.001 \sim 10 \text{ng/ml}$  となるように加える。さらに前記 1 (4) で得られた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは前記 2 (9) で得られた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  ヒト化抗体産生形質転換株の培養上清、または前記 1 (6) あるいは 2 (9) で得られた精製抗体を加え  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、 $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  5% 気流下で 2~5 日間培養する。培養終了後、各ウェルから細胞標本作製し、メイ・グリュントワルト・ギムザ染色法 (染色法のすべて: 医歯薬出版株式会社 1988 年) などの方法にて染色し、好酸球の割合を求める。抗ヒト IL-5R  $\alpha$  抗体非存在下での好酸球の割合と該抗体存在下での好酸球の割合とを比較することにより、該モノクローナル抗体に IL-5 依存性のヒト好酸球の生存延長に対する抑制活性があるか否か確認する。

### (4) モノクローナル抗体による shIL-5R $\alpha$ 定量

前記 1 (6) あるいは 2 (9) で得られた  $0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$  の精製抗体を一次抗



体としてプレートコートし、前記 1 (1) で得られた 0.1~10,000ng/ml の精製 shIL-5R  $\alpha$ 、もしくはヒト血清などの検体を反応させる。プレートをよく洗浄した後、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した前記 1 (6) あるいは 2 (9) で得られた精製抗体のうち一次抗体として使用した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  抗体とは異なるエピトープを認識する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  抗体を反応させた後、標識物質に応じた反応を行なう。精製 shIL-5R に対する反応性をもとに検量線を描き、検体中の shIL-5R 濃度を算出する。

#### (5) ウェスタンブロッティング法による shIL-5R $\alpha$ の検出

前記 1 (1) で得られた精製 shIL-5R  $\alpha$  を SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により分画後、ポリビニリデンジフルオリド膜 [以下、PVDF 膜と称す (ミリポア社製)] に転写する。1~10% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS に浸して 4℃ にて一晩放置してブロッキング後、0.05% Tween を含む PBS にてよく洗浄する。該 PVDF 膜を前記 1 (5) で得られたハイブリドーマの培養上清あるいは前記 1 (6) で得られた精製抗体溶液に室温で 2 時間浸し、0.05% Tween を含む PBS にてよく洗浄する。さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質、放射線化合物等で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体または抗ラットイムノグロブリン抗体を含む溶液に該 PVDF 膜を室温で 1 時間浸し、0.05% Tween を含む PBS にてよく洗浄する。洗浄液をよく除いた後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行い、精製 shIL-5R  $\alpha$  の分子量に一致する蛋白質と反応するか否かを確認する。

#### (6) shIL-5R $\alpha$ の免疫沈降

96 ウェルの ELISA 用プラスチックプレートに抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を PBS など 10~1000 倍に希釈したものを 50~200  $\mu$ l/ウェルずつ分注し、4℃ にて一晩あるいは室温にて 2 時間以上放置して吸着させる。PBS にて該プレートを洗浄後、1~10% の BSA などを含む PBS など 300  $\mu$ l/ウェルずつ分注して 4℃ にて一晩あるいは室温にて 30 分以上放置してブロッキングを行う。PBS にて該プレートを洗浄後、前記 1 (5) で得られたハイブリドーマの培養上清あるいは前記 1 (6) で得られた

精製抗体溶液 ( $0.01 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ ) を  $50 \sim 200 \mu\text{l}$ /ウェルずつ加え、 $4^\circ\text{C}$  にて一晩放置して抗体を吸着させる。該プレート洗净後、前記 1 (1) で得られた shIL-5R  $\alpha$  を 1%BSA を含む PBS など  $0.1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$  の濃度に希釈したものを  $50 \sim 200 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させる。該プレートを 0.05%Tween を含む PBS など洗净後、1～5 倍濃度の SDS-PAGE 用サンプルバッファーを  $50 \sim 200 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注し、30 分以上室温で振とうする。必要に応じ PBS で希釈した後、該溶液を 1 レーン当たり  $5 \sim 25 \mu\text{l}$  ずつ加えて SDS-PAGE により分画後、定法に従い PVDF 膜などに転写を行う。該 PVDF 膜を前記 5 (5) に示したような方法でウェスタンブロッティング法を行い、shIL-5R  $\alpha$  を検出する。

#### 図面の簡単な説明

- 第 1 図は、プラスミド pAGE210 の造成工程を示した図である。
- 第 2 図は、プラスミド pCAGGS-h5R.25 制限地図を示した図である。
- 第 3 図は、プラスミド pAI234 の造成工程を示した図である。
- 第 4 図は、プラスミド pAI230 の造成工程を示した図である。
- 第 5 図は、プラスミド pAI282 の造成工程を示した図である。
- 第 6 図は、プラスミド pAI283 および pAI285 の造成工程を示した図である。
- 第 7 図は、プラスミド pAI284 および pAI289 の造成工程を示した図である。
- 第 8 図は、プラスミド pAI294 および pAI295 の造成工程を示した図である。
- 第 9 図は、プラスミド pAI299 および pAI301 の造成工程を示した図である。
- 第 10 図は、プラスミド pAI292 の造成工程を示した図である。
- 第 11 図は、プラスミド pAI297 の造成工程を示した図である。
- 第 12 図は、プラスミド pMKex1 の造成工程を示した図である。
- 第 13 図は、プラスミド pAI263 の造成工程を示した図である。
- 第 14 図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1257 および KM1259 の酵素免疫測定法におけるヒト IL-5R  $\alpha$  - ヒト免疫グロブリン定常領域融合蛋白に対する結合反応性を示す。
- 第 15 図は、プラスミド pBSA の造成工程を示した図である。

第16図は、プラスミドpBSAEの造成工程を示した図である。

第17図は、プラスミドpBSH-Sの造成工程を示した図である。

第18図は、プラスミドpBSK-Hの造成工程を示した図である。

第19図は、プラスミドpBSH-SAおよびpBSK-HAの造成工程を示した図である。

第20図は、プラスミドpBSH-SAEおよびpBSK-HAEの造成工程を示した図である。

第21図は、プラスミドpBSH-SAEEおよびpBSK-HAEEの造成工程を示した図である。

第22図は、プラスミドpBSK-HAEESalの造成工程を示した図である。

第23図は、プラスミドpBSX-Sの造成工程を示した図である。

第24図は、プラスミドpBSX-SAの造成工程を示した図である。

第25図は、プラスミドpBSSCの造成工程を示した図である。

第26図は、プラスミドpBSMoの造成工程を示した図である。

第27図は、プラスミドpBSMoSの造成工程を示した図である。

第28図は、プラスミドpChi IgLAISの造成工程を示した図である。

第29図は、プラスミドpMohC $\kappa$ の造成工程を示した図である。

第30図は、プラスミドpBSMoSalの造成工程を示した図である。

第31図は、プラスミドpBSMoSalSの造成工程を示した図である。

第32図は、プラスミドpBShC $\gamma$ 1の造成工程を示した図である。

第33図は、プラスミドpMohC $\gamma$ 1の造成工程を示した図である。

第34図は、プラスミドpMo $\gamma$ 1SPの造成工程を示した図である。

第35図は、プラスミドpMo $\kappa$  $\gamma$ 1SPの造成工程を示した図である。

第36図は、プラスミドpKANTEX93の造成工程を示した図である。

第37図は、プラスミドpKANTEX1259Hの造成工程を示した図である。

第38図は、プラスミドpKANTEX1259の造成工程を示した図である。

第39図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 の SDS-PAGE (4~15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示す。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った。左側の M が高分子マーカー、1 が KM1399、右側の M が低分子マーカー、1 が KM1399 の泳動パターンをそれぞれ示

す。

第40図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖マウス抗体 KM1259 と抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 のヒト IL-5 とヒト IL-5R  $\alpha$  鎖の結合に対する阻害活性を示す。縦軸は阻害活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が KM1259、○が KM1399 の活性をそれぞれ示す。

第41図は、プラスミド pT1259 の造成工程を示した図である。

第42図は、プラスミド pT1259 を用いた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体の一過性発現による活性評価を示す。縦軸にヒト IL-5 とヒト IL-5R  $\alpha$  鎖の結合に対する阻害活性、横軸に一過性発現培養上清の希釈倍率をそれぞれ示す。

第43図は、プラスミド phKM1259HV0 の造成工程を示した図である。

第44図は、プラスミド phKM1259LV0 の造成工程を示した図である。

第45図は、プラスミド pKANTEX1259HV0 の造成工程を示した図である。

第46図は、プラスミド pKANTEX1259HV0LV0 の造成工程を示した図である。

第47図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の SDS-PAGE (4~15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示す。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った。M が分子量マーカー、1 が KM8397 の泳動パターンをそれぞれ示す。

第48図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 と抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する結合活性を示す。縦軸はヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が KM1399、○が KM8397 の活性をそれぞれ示す。

第49図は、一過性発現培養上清中の各種改変バージョンの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体のヒト IL-5 とヒト IL-5R  $\alpha$  鎖の結合に対する阻害活性を評価した結果を示す。縦軸は阻害活性、横軸は各サンプル名をそれぞれ示す。キメラ抗体 KM1399 の活性を 100 とした時の相対活性値をそれぞれ示す。

第50図は、精製した各種改変バージョンの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する結合活性を示す。縦軸はヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。上段の●が KM1399、○が HV, 0LV, 0、

■がHV. 2LV. 0、□がHV. 0LV. 3、▲がHV. 3LV. 3、下段の●がKM1399、○がHV. 1LV. 0、■がHV. 3LV. 0、□がHV. 0LV. 4、▲がHV. 1LV. 4、△がHV. 2LV. 4、×がHV. 3LV. 4の活性をそれぞれ示す。

第51図は、プラスミド pBShC  $\gamma$  4 の造成工程を示した図である。

第52図は、プラスミド pKANTEX1259  $\gamma$  4 および pKANTEX1259HV3LV0  $\gamma$  4 の造成工程を示した図である。

第53図は、ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体抗 KM7399、ヒト抗体 IgG4 サブクラスのヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM9399 の SDS-PAGE (4~15%グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示す。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った。左側の M が高分子マーカー、1 が KM9399、2 が KM7399、右側の M が低分子マーカー、1 が KM9399、2 が KM7399 の泳動パターンをそれぞれ示す。

第54図は、ヒト抗体 IgG1 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399、ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM7399、ヒト抗体 IgG1 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8399、ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM9399 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する結合活性を示す。縦軸はヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が KM1399、●が KM7399、□が KM8399、■が KM9399 の活性をそれぞれ示す。

第55図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1257、KM1259、KM1486、KM1399、KM7399、KM8399 および KM9399 のヒト IL-5R 遺伝子導入 CTLL-2 細胞との反応性をフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

第56図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1257、KM1259、KM1486、KM1399、KM7399、KM8399 および KM9399 のヒト IL-5R 遺伝子導入 CTLL-2 細胞の IL-5 依存性増殖に対する抑制作用を検討した結果を示す。

第57図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1259 のヒト好酸球との反応性をフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

第58図は、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1257、KM1259、KM1486、KM1399、

KM7399、KM8399およびKM9399のヒト好酸球生存抑制作用を検討した結果を示す。

第59図は、抗ヒトIL-5R  $\alpha$ モノクローナル抗体KM1257およびビオチン標識KM1259による可溶性ヒトIL-5R  $\alpha$ 定量系に関して検討した結果を示す。

第60図は、抗ヒトIL-5R  $\alpha$ モノクローナル抗体KM1257、KM1259およびKM1486を用いたウェスタンブロッティング法によるshIL-5R  $\alpha$ の検出を行った結果を示す。

第61図は、抗ヒトIL-5R  $\alpha$ モノクローナル抗体KM1257、KM1259およびKM1486を用いたshIL-5R  $\alpha$ の免疫沈降の結果を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

#### 実施例 1

##### 1. 抗原の調製

##### (1) 動物細胞用発現ベクターpAGE210 の構築

動物細胞用発現ベクターpAGE207 (特開平 6-46841) と pAGE148 (特開平 6-205694) を用いて、動物細胞用発現ベクターpAGE210 の構築を以下のように行った。

プラスミド pAGE207 あるいは pAGE148 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM ジチオスレイトール (以下、DTT という) からなる緩衝液 30  $\mu$ l に溶解し、さらに 10 単位の ClaI、および KpnI (いずれも宝酒造社製、以下、特別な指示がない限り、制限酵素は宝酒造社製) を加えて 37°C で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、pAGE207 からは SV40 の初期プロモーターとエンハンサー (以下、P<sub>SE</sub> という)、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびアンピシリン (以下、Ap という) 耐性遺伝子を含む 4.7kb の DNA 断片を約 0.5  $\mu$ g、pAGE148 からはジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、dhfr という) 遺伝子を含む 4.3kb の DNA 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

このようにして得られた pAGE207 の ClaI-KpnI 断片 50ng と pAGE148 の KpnI-ClaI 断片 50ng とを 20  $\mu$ l の T4DNA リガーゼ緩衝液 [66mM トリス-塩酸 (pH7.5)、6.6mM 塩化マグネシウム、10mM DTT および 0.1mM アデノシン三リン

酸（以下、ATP という）からなる緩衝液、以下同様] に溶解し、T4DNA リガーゼ（宝酒造社製、以下同様）200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 1 図に示したプラスミド pAGE210 を得た。

（2）shIL-5R  $\alpha$  発現ベクター構築を目的とした shIL-5R  $\alpha$  cDNA のカセット化

shIL-5R  $\alpha$  発現ベクター構築のため shIL-5R  $\alpha$  cDNA の 5' および 3' 非翻訳領域の改変、並びに制限酵素認識配列の導入を以下に示す手順に従い PCR 法 [マニアティス (Maniatis) ら編集、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、14. 2、Cold Spring Harbor Laboratory 1989 年] を用いて行った。

プラスミド pCAGGS-h5R. 25 は shIL-5R  $\alpha$  cDNA が公知のプラスミド pCAGGS [ジーン (Gene), 108, 193 (1991)] に第 2 図に示すように挿入されたものである [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 175, 341 (1992)]。この pCAGGS-h5R. 25 の 3  $\mu$ g を 30  $\mu$ l の 50mM トリスー塩酸 (pH7. 5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の EcoRI を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、shIL-5R  $\alpha$  cDNA を含む 1. 4kb の DNA 断片を約 0. 3  $\mu$ g 回収した。

次に上記で得られた DNA 断片 1ng を 50  $\mu$ l の PCR 緩衝液 [50mM 塩化カリウム、10mM トリスー塩酸 (pH8. 3)、1. 5mM 塩化マグネシウム、0. 2mM デオキシアデノシン三リン酸（以下、dATP という）、0. 2mM デオキシグアノシン三リン酸（以下、dGTP という）、0. 2mM デオキシシトシン三リン酸（以下、dCTP という）、0. 2mM デオキシチミジン三リン酸（以下、dTTP という）からなる緩衝液] に溶解し、50pmol の配列番号 1 に示した塩基配列を有する合成 DNA および配列番号 2 に示した塩基配列を有する合成 DNA [いずれも自動 DNA 合成機；380A（アプライド・バイオシステムズ社；Applied Biosystems Co., Ltd 製）を用いて合成したもの、以下同様]、さらにベント DNA ポリメラーゼ [ニューイングランド・バイオラボラトリーズ社 (New England BioLabs. Inc.) 製、以下同様] 1. 6

単位を加えて、94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で3分間からなる一連の反応条件下でパーキン・エルマー社製 DNA サーマルサイクラーを用いて（以下同様）30 サイクルの PCR 反応を行った。反応終了後、該反応液 10  $\mu$ l に 100mM トリスー塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化マグネシウム、500mM 塩化ナトリウムおよび 10mM DTT からなる緩衝液 2  $\mu$ l、8  $\mu$ l の蒸留水、10 単位の HindIII を加え 37℃で 4 時間反応させた後、該反応液よりエタノール沈殿 [マニアティス (Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、E. 10、Cold Spring Harbor Laboratory 1989 年] により DNA 断片を回収し、20  $\mu$ l の 20mM トリスー塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、1.0kb の DNA 断片を約 0.3  $\mu$ g 回収した。

一方プラスミド pUC19 (ファルマシア・バイオテク社) 3  $\mu$ g を 10mM トリスー塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に溶解し、HindIII 10 単位を加えて 37℃で 4 時間反応させた後、該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリスー塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、pUC19 の HindIII/BamHI 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

pUC19 の HindIII/BamHI 断片 100ng と shIL-5R  $\alpha$  cDNA 断片 50ng とを 20  $\mu$ l の T4DNA リガーゼ緩衝液に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 3 図に示したプラスミド pAI234 を得た。

### (3) ヒト可溶性 IL-5R $\alpha$ 発現ベクターの構築

実施例 1 (1) で得られた pAGE210 の HindIII-BamHI 断片と 1 (2) で得られた pAI234 の shIL-5R  $\alpha$  cDNA を含む HindIII-BamHI 断片とを連結することにより shIL-5R  $\alpha$  発現ベクター pAI230 の構築を以下のように行った。



pAGE210 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5) 、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の HindIII を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5) 、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、9.0kb の DNA 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

pAI234 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5) 、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の HindIII を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5) 、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、1.0kb の DNA 断片を約 0.3  $\mu$ g 回収した。

次に pAGE210 の HindIII-BamHI 断片 300ng と pAI234 の HindIII-BamHI 断片 50ng とを T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃ で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 4 図に示したプラスミド pAI230 を得た。

#### (4) シグナル配列の改変

shIL-5R  $\alpha$  の動物細胞による効率的な生産を行うため、shIL-5R  $\alpha$  をコードする cDNA に関してそのシグナル配列の改変をシグナル配列の 3' 末端側への EcoRV 認識配列の導入、続いて合成 DNA を用いてヒト成長ホルモン [サイエンス (Science), 205, 602 (1979)] あるいは抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体 KM871 (特開平 5-304989) のシグナルシーケンスへの改変を以下の手順に従って行った。

実施例 1 (2) で得られたプラスミド pAI234 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5) 、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からな

る緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の HindIII を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、1.0kb の DNA 断片を約 0.3  $\mu$ g 回収した。

一方プラスミド pUC19 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に溶解し、10 単位の HincII を加えて 37℃ で 4 時間反応させた後、該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、pUC19 の HincII 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

上記で得た DNA 断片約 1ng を PCR 緩衝液 50  $\mu$ l に溶解し、50pmol の配列番号 2 に示した塩基配列を有する合成 DNA および配列番号 3 に示した塩基配列を有する合成 DNA、さらにベント DNA ポリメラーゼ 1.6 単位を加えて、94℃ で 1 分間、48℃ で 2 分間、72℃ で 3 分間からなる一連の反応条件下で 30 サイクルの PCR 反応を行った。該反応液をアガロースゲルにて分画後、約 0.9kb の hIL-5R  $\alpha$  の一部をコードする cDNA 断片 0.5  $\mu$ g を回収し、そのうち 50ng の DNA と pUC19 の HincII 断片 100ng とを T4 リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃ で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 5 図に示したプラスミド pAI280 を得た。得られたプラスミド pAI280 の 3  $\mu$ g を 30  $\mu$ l の 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の XbaI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、2.8kb の DNA 断片を約 0.8  $\mu$ g 回収した。

一方、プラスミド pAI234 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の XbaI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、0.8kb の DNA 断片を約 0.2  $\mu$ g 回収した。

次に pAI280 の XbaI-BamHI 断片 200ng と pAI234 の XbaI-BamHI 断片 50ng とを T4 リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃ で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 5 図に示したプラスミド pAI282 を得た。この pAI282 の 3  $\mu$ g を 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の EcoRV を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、0.9kb の DNA 断片を約 0.3  $\mu$ g 回収した。

配列番号 4、5 に示した塩基配列を有する合成 DNA のそれぞれ 1  $\mu$ g を 10  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、95℃ で 5 分間加熱した後 30 分間かけて室温まで冷却しアニーリングを行った。実施例 1 (2) で得られた pUC19 の HindIII-BamHI 断片 100ng、pAI282 の EcoRV-BamHI 断片 50ng、上記の通りアニーリングを行った配列番号 4 および 5 に示した塩基配列を有する合成 DNA 50ng とを T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、さらに T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃ で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 6 図に示したプラスミド pAI283 を得た。

配列番号 6 および 9 に示した塩基配列を有する合成 DNA をそれぞれ 1  $\mu$ g を 10  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、95℃ で 5 分間加熱した後 30 分間かけて室温まで冷

却しアニーリングを行った。該反応液に 500mM トリスー塩酸 (pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT、1mM EDTA からなる緩衝液 2.5  $\mu$ l、10mM ATP 溶液 2.5  $\mu$ l、蒸留水 9  $\mu$ l、さらに T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) 5 単位を加え 37℃で 2 時間リン酸化反応を行った。これとは別に配列番号 7 および 8 に示した塩基配列を有する合成 DNA をそれぞれ 1  $\mu$ g を 10  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、95℃で 5 分間加熱した後 30 分間かけて室温まで冷却しアニーリングを行った。

pUC19 の HindIII-BamHI 断片 100ng、pAI282 の EcoRV-BamHI 断片 50ng、上記のように調製した合成 DNA をそれぞれ 50ng を T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 6 図に示したプラスミド pAI285 を得た。

#### (5) シグナル配列を改変した shIL-5R $\alpha$ 発現ベクターの構築

実施例 1 (1) で得られた pAGE210 の HindIII-BamHI 断片と実施例 1 (4) で得られた pAI283 あるいは pAI285 のヒト可溶性 IL-5R  $\alpha$  cDNA を含む HindIII-BamHI 断片とを連結することによりヒト可溶性 IL-5R  $\alpha$  発現ベクター pAI284 および pAI289 の構築を以下のとおり行った。

pAI283 および pAI285 の 3  $\mu$ g を 10mM トリスー塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の HindIII を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリスー塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、1.0kb の DNA 断片をそれぞれ約 0.3  $\mu$ g 回収した。

pAGE210 の HindIII-BamHI 断片 300ng と pAI283 あるいは pAI285 の HindIII-BamHI 断片 50ng とを T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得ら

れた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 7 図に示したプラスミド pAI284 および pAI289 を得た。

(6) ヒト IL-5R  $\alpha$  とヒト免疫グロブリン定常領域との融合蛋白の作製

ヒト IL-5R  $\alpha$  の細胞外領域とヒト免疫グロブリン定常領域 (以下、Fc と称す) とが (Gly-Ser-Gly)<sub>4</sub> というアミノ酸配列のリンカーを介して結合された融合蛋白 (以下、hIL-5R  $\alpha$ -Fc と称す) の作製を以下に示す手順に従って行った。

ヒト免疫グロブリン定常領域をコードする cDNA はヒト型キメラ抗体 H 鎖発現用ベクター pChilgHB2 (特開平 5-304989) 上のヒト IgG1 定常領域をコードする部分を用いた。まず、pChilgHB2 の約 1ng を PCR 緩衝液 50  $\mu$ l に溶解し、50pmol の配列番号 10 に示した塩基配列を有する合成 DNA および配列番号 11 に示した塩基配列を有する合成 DNA、さらにベント DNA ポリメラーゼ 1.6 単位を加えて、94℃で 1 分間、48℃で 2 分間、72℃で 3 分間からなる一連の反応条件下で 30 サイクルの PCR 反応を行った。反応終了後、該反応液 20  $\mu$ l に 200mM トリスー塩酸 (pH8.5)、100mM 塩化マグネシウム、1000mM 塩化カリウムおよび 10mM からなる緩衝液 2.5  $\mu$ l、蒸留水 2.5  $\mu$ l、10 単位の BamHI を加え 37℃で 4 時間させた。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動により分画し、ヒト IgG1 定常領域をコードする cDNA を含む 0.7kb の DNA 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

実施例 1 (4) で得られた pAI283 の約 1ng を PCR 緩衝液 50  $\mu$ l に溶解し、50pmol の配列番号 12 に示した塩基配列を有する合成 DNA および配列番号 13 に示した塩基配列を有する合成 DNA、さらにベント DNA ポリメラーゼ 1.6 単位を加えて、94℃で 1 分間、48℃で 2 分間、72℃で 3 分間からなる一連の反応条件下で 30 サイクルの PCR 反応を行った。反応終了後、該反応液 20  $\mu$ l に 100mM トリスー塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化マグネシウム、500mM 塩化ナトリウムおよび 10mM DTT からなる緩衝液 2.5  $\mu$ l、蒸留水 2.5  $\mu$ l、10 単位の HindIII を加え 37℃で 4 時間反応させた。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動により分画し、該反応液をアガロース電気泳動により分画後、hIL-5R  $\alpha$  の細胞外領域をコードする cDNA を含む 1.0kb の DNA 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

ヒト IgG1 定常領域をコードする cDNA を含む 0.7kb の DNA 断片 50ng、hIL-5R

$\alpha$  の細胞外領域をコードする cDNA を含む DNA 断片 50ng、pUC19 の HindIII-BamHI 断片 100ng を T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$  l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 8 図に示したプラスミド pAI294 を得た。

一方、実施例 1 (4) で得られた pAI285 をテンプレートとして配列番号 1 3 および 1 4 に示した塩基配列を有する合成 DNA をプライマーとして用いて上記と同様の条件で PCR 反応を行い、反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動により分画し、該反応液をアガロース電気泳動により分画後、ヒト IL-5R  $\alpha$  の細胞外領域をコードする cDNA を含む 1.0kb の DNA 断片を約 0.5  $\mu$  g 回収した。得られた DNA 断片 50ng、ヒト IgG1 定常領域をコードする cDNA を含む 0.7kb の DNA 断片 50ng、pUC19 の HindIII-BamHI 断片 100ng を T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$  l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 8 図に示したプラスミド pAI295 を得た。

#### (7) 融合蛋白発現ベクターの構築

実施例 1 (1) で得られた pAGE210 の HindIII-BamHI 断片と実施例 1 (6) で得られた pAI294 の hIL-5R  $\alpha$ -Fc をコードする cDNA を含む HindIII-BamHI 断片とを連結することにより hIL-5R  $\alpha$ -Fc 発現ベクター pAI299 の構築を以下のように行った。

プラスミド pAI294 の 3  $\mu$  g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の HindIII を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$  l に再溶解し、更に 10 単位の BamHI を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液をアガロース電気泳動により分画後、ヒト IL-5R  $\alpha$  とヒト免疫グロブリン定常領域の融合蛋白をコードする cDNA を含む 1.7kb の DNA 断片を約 0.4  $\mu$  g 回収した。

pAGE210 の HindIII-BamHI 断片 100ng と pAI294 の HindIII-BamHI 断片 50ng とを T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で16時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第9図に示したプラスミド pAI299 を得た。

また、上記と同様にして pAGE210 の HindIII-BamHI 断片と実施例 1 (6) で得られた pAI295 の hIL-5R  $\alpha$ -Fc をコードする cDNA を含む HindIII-BamHI 断片とを連結することにより hIL-5R  $\alpha$ -Fc 発現ベクター pAI301 の構築を行った。

#### (8) 昆虫細胞による shIL-5R $\alpha$ 発現を行うための組み換えウィルスの作製

昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウィルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウィルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウィルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキット (製品番号 PM-21001K) を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

実施例 1 (4) で得られた pAI285 あるいは実施例 1 (6) で得られた pAI294 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の HindIII を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20  $\mu$ l の DNA ポリメラーゼ I 緩衝液 [5mM トリス-塩酸 (pH7.5)、1mM 硫酸マグネシウム、0.01mM DTT、5  $\mu$ g/ml 牛血清アルブミン、0.08mM dATP、0.08mM dGTP、0.08mM dCTP、0.08mM dTTP からなる緩衝液、以下同様] に溶解し、5 単位の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I クレノー断片 (宝酒造社製、以下同様) を加え、22℃で 30 分間反応させ、HindIII 消化によって生じた 5' 突出末端を平滑末端に変えた。さらに該反応液をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l と 10 単位の BamHI を加え

て 37℃で 4 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、sh1L-5R  $\alpha$  をコードする cDNA を含む約 1.0kb の DNA 断片を約 0.3  $\mu$ g、ヒト IL-5R  $\alpha$  とヒト免疫グロブリン定常領域の融合蛋白をコードする cDNA を含む 1.7kb の DNA 断片を約 0.3  $\mu$ g 回収した。

次にファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキットに含まれるプラスミド pVL1393 の 3  $\mu$ g を 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の EcoRI を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿法により DNA 断片を回収し、20  $\mu$ l の DNA ポリメラーゼ I 緩衝液に溶解し、5 単位の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I クレノー断片を加え、22℃で 30 分間反応させ、EcoRI 消化によって生じた 5' 突出末端を平滑末端に変えた。さらに該反応液をフェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の BglII を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 9.6kb の DNA 断片を約 0.9  $\mu$ g 回収した。

次に上記で得られた pVL1393 の EcoRI (平滑末端) - BglII 断片 200n と pAI285 あるいは pAI294 の HindIII (平滑末端) - BamHI 断片 50ng とを T4DNA リガーゼ緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 10 図および第 11 図に示したプラスミド pAI292 および pAI297 を得た。

続く組み換えウィルスの作製は TMN-FH インセクトメディウム (ファーミンジェン社製) にて培養した昆虫細胞 Sf9 (ファーミンジェン社製より入手) に線状バキュロウィルス DNA [バキュロゴールド・バキュロウィルス DNA (BaculoGold baculovirus DNA)、ファーミンジェン社製] および作製したトランスファーベクター DNA をリポフェクチン法にて導入すること [蛋白質核酸酵素、37, 2701 (1992)] により行い組み換えバキュロウィルスを以下のように作製した。



pAI292 あるいは pAI297 の  $1 \mu\text{g}$  と線状バキュロウイルス DNA の  $20\text{ng}$  とを  $12 \mu\text{l}$  の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン  $6 \mu\text{l}$  と蒸留水  $6 \mu\text{l}$  とを混和したものを加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞  $1 \times 10^6$  個を  $2\text{ml}$  の Sf900-II 培地 [ギブコ (Gibco) 社製] に懸濁し、直径  $35\text{mm}$  の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA、線状バキュロウイルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え  $27^\circ\text{C}$  で 3 日間培養後、組み換えウイルスを含む培養上清  $1\text{ml}$  を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地  $1\text{ml}$  を加え、さらに  $27^\circ\text{C}$  で 3 日間培養し組み換えウイルスを含む培養上清をさらに  $1.5\text{ml}$  得た。

次に蛋白発現に用いるために得られた組み換えウイルスを以下の手順で増殖させた。

Sf9 細胞  $2 \times 10^7$  個を  $10\text{ml}$  の Sf900-II 培地に懸濁し、 $175\text{cm}^2$  フラスコ (グライナー社製) に入れて室温で 1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに  $15\text{ml}$  の TMN-FH インセクトメディウムと上記の組み換えウイルスを含む培養上清のうち  $1\text{ml}$  を加え  $27^\circ\text{C}$  で 3 日間培養した。培養後上清を  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離して細胞を除き、蛋白発現に使用する組み換えウイルス溶液を得た。

得られた組み換えウイルス溶液についてウイルスの力価を以下の方法で算定した (ファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキット・マニュアル)。Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を  $4\text{ml}$  の Sf900-II 培地に懸濁し、直径  $60\text{mm}$  の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たに Sf900-II 培地  $400 \mu\text{l}$  と Sf900-II 培地で 10,000 倍に希釈した上記組み換えウイルス溶液を加え室温で 1 時間放置した後、培地を除き  $5\text{ml}$  の 1%低融点アガロース [アガープレート・アガロース (Agarplaque Agarose)、ファーミンジェン社製] を含む培地 [滅菌した  $1\text{ml}$  の 5%アガープレートプラス・アガロース水溶液と  $4\text{ml}$  の TMN-FH インセクトメディウムを混和し、 $42^\circ\text{C}$  に保温したもの] を該シャーレに流し込んだ。室温で 15 分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、密閉可能なプラスチック製容

器に該シャーレを入れ、27℃で6日間培養した。該シャーレに0.01% ニュートラルレッドを含むPBS1mlを加えさらに1日間培養した後、出現したプラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約  $1 \times 10^7$  プラークフォーミングユニット/ml (以下、PFU/ml と表記する) のウィルスを含んでいることがわかった。

(9) 動物細胞における shIL-5R  $\alpha$  あるいは hIL-5R  $\alpha$ -Fc の発現

動物細胞へのプラスミドの導入は、宮地らの方法に従い、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] を用いて行った。

実施例 1 (5) で得られた pAI289 あるいは実施例 1 (7) で得られた pAI301 の 4  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  個の dhfr 遺伝子を欠損した CHO 細胞 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), 77, 4216 (1980)] へ導入後、40ml の RPMI1640-FCS (10) [FCS を 10%、7.5%  $\text{NaHCO}_3$  を 1/40 量、200mM L-グルタミン溶液 (ギブコ社製) を 3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (ギブコ社製、5000units/ml ペニシリンおよび 5000  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン含有) を 0.5% 含む RPMI1640 培地 (日水製薬社製)] に懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレートに 200  $\mu$ l/ウェルずつ分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37℃、24 時間培養した後、ハイグロマイシン (ギブコ社製) を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより細胞を回収し、0.5mg/ml ハイグロマイシン、50nM メソトレキセート (以下、MTX と称す) を含む RPMI1640-FCS (10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレートに 2ml/ウェル分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37℃で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性クローンを誘導した。

上記で得られた 50nM MTX 耐性クローンについて、0.5mg/ml ハイグロマイシン、200nM MTX を含む RPMI1640-FCS (10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレートに 2ml/ウェル分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37℃で 1~2 週間培養して、200nM MTX 耐性クローンを誘導した。

さらに、上記で得られた 200nM MTX 耐性クローンについて、0.5mg/ml ハイグロマイシン、500nM MTX を含む RPMI1640-FCS(10)培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレートに 2ml/ウェル分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37℃で 1～2 週間培養して、500nM MTX 耐性クローンを誘導した。

上記形質転換株を CHO 細胞用無血清培地 CHO-S-SFMII 培地（ギブコ社製）に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、225cm<sup>2</sup> フラスコ（グライナー社製）に 100ml ずつ分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで、37℃、5～7 日間培養し、コンフルエントになった時点で培養液を回収した。

hIL-5R  $\alpha$  の培養上清からの精製は以下のようにして行った。pAI289 による形質転換株の培養液 1 リットルに塩化ナトリウム 29.2g、1M トリスー塩酸 (pH7.4) 20ml を加えた後、1N 水酸化ナトリウム溶液を用いて該溶液の pH を pH7.4 に調整した。カラムにコンカナバリン A-セファロース（ファルマシア社製）ゲル約 10ml を充填し、20mM トリスー塩酸 (pH7.4)、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 50ml で 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製した shIL-5R  $\alpha$  を含む液を 0.5ml/分の流速でコンカナバリン A-セファロースカラムに通塔した。さらに 20mM トリスー塩酸 (pH7.4)、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 80ml で 0.5ml/分の流速で洗浄した後、20mM トリスー塩酸 (pH7.4)、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 15ml、0.5M  $\alpha$ -メチルマンノサイド、20mM トリスー塩酸 (pH7.4)、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 15ml を用いて  $\alpha$ -メチルマンノサイドの濃度を 0～0.5M まで直線的に変化させることによりコンカナバリン A-セファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に 1ml ずつ溶出液を分画した（フラクション 1～30）。さらに、1M  $\alpha$ -メチルマンノサイド、20mM トリスー塩酸 (pH7.4)、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 20ml を通塔し、2ml ずつ分画した（フラクション 31～40）。各フラクションに含まれる蛋白濃度を蛋白濃度測定キット（バイオラッド社製）を用いて測定し、蛋白濃度の高いフラクション 10～40 までを回収した。該蛋白溶液をアミコン社製セントリコン-30 を用いて約 10 倍に濃縮し、透析用チューブに封入して PBS に対して透析を行った。以上のようにして、精製 shIL-5R  $\alpha$ （蛋白質濃

度 4mg/ml、3.5ml) を得た。

一方、hIL-5R  $\alpha$ -Fc は以下のようにして得た。カラムにプロテインA-セファロース・ゲル約 5ml を充填し、50ml の PBS で洗浄を行った。洗浄後、上記の pAI301 による形質転換株の培養液約 1 リットルを 0.5ml/分の流速でプロテインA-セファロースカラムに通塔した。さらに 50ml の PBS でカラムを洗浄後、20ml の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH3.0) を通塔しプロテインA-セファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に 1ml ずつ溶出液を分画した。各フラクションには 2M トリス-塩酸 (pH9.0) 0.15ml を加えて pH を調整した。各フラクションに含まれる蛋白濃度を蛋白濃度測定キット (パイオラッド社製) を用いて測定し、蛋白濃度の高いフラクションを回収した。該蛋白溶液を透析用チューブに封入して PBS に対して透析を行った。以上のようにして精製 hIL-5R  $\alpha$ -Fc (蛋白質濃度 1.8mg/ml、5.5ml) を得た。

(10) 昆虫細胞による shIL-5R  $\alpha$ あるいは hIL-5R  $\alpha$ -Fc の発現

ファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキットに添付されているマニュアルに従い以下の手順により shIL-5R  $\alpha$ および hIL-5R  $\alpha$ -Fc の発現を行った。

培養液からの shIL-5R  $\alpha$ および hIL-5R  $\alpha$ -Fc の回収はコンカナバリンA-セファロースとジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、あるいはプロテインA-セファロース (いずれもファルマシア・バイオテック社製) を用いてそれぞれ行った。

shIL-5R  $\alpha$ は以下のようにして得た。Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を 225cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) に 10%FCS を含むグレイスズ・インセクト・メディウム (Grace's Insect Medium、ギブコ社製) 45ml に懸濁し、27℃で 3 ~ 4 日間培養した。培養上清を除き新たに 10%FCS を含むグレイスズ・インセクト・メディウム 30ml と実施例 1 の 1 (8) で得られたトランスファーベクター pAI292 由来の組み換えウィルスを約  $1 \times 10^7$  PFU/ml の濃度で含む溶液を 1ml 加えた。さらに 27℃で 1 日間培養した後、上清を除き新たに Sf900-II 培地 45ml を加え 2 ~ 3 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し 1,500  $\times$  g で 10 分間遠心分離を

行い上清を得た。該培養液に最終濃度 0.5 M となるように塩化ナトリウムを加え、さらに 1/50 容量の 1M トリス-塩酸 (pH7.4) を加えた後、該溶液の pH を 1N 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH7.4 に調整した。

カラムにコンカナバリン A-セファロース・ゲル約 10ml を充填し、20mM トリス-塩酸 (pH7.4) 、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 50ml で 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調整した shIL-5R  $\alpha$  を含む培養液 500ml を 0.5ml/分の流速でコンカナバリン A-セファロースカラムに通塔した。さらに 20mM トリス-塩酸 (pH7.4) 、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 80ml で 0.5ml/分の流速で洗浄した後、1M  $\alpha$ -メチルマンノサイド、20mM トリス-塩酸 (pH7.4) 、0.5M 塩化ナトリウムからなる緩衝液 60ml を通塔しコンカナバリン A-セファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に 2ml ずつ溶出液を分画した。各フラクションに含まれる蛋白濃度を蛋白濃度測定キット (バイオラッド社製) を用いて測定し、蛋白濃度の高いフラクションを 44ml 回収し、20mM トリス-塩酸 (pH7.4) に対して透析した。さらに 900ml の上記のように調整した shIL-5R  $\alpha$  を含む培養液より同様の操作により、蛋白濃度の高いフラクションを 40ml 回収し、20mM トリス-塩酸 (pH7.4) に対して透析した。

透析後、上記の該蛋白溶液を合わせて 10ml のジエチルアミノエチル (DEAE)-セファロース・ゲルを充填したカラムに通塔し、蛋白質を吸着させた。カラムからの shIL-5R  $\alpha$  の溶出は塩化ナトリウム濃度を 0~0.5M まで直線的に変化させることにより行い、shIL-5R  $\alpha$  を高濃度を含むフラクションを 4ml 回収した。該蛋白溶液を透析用チューブに封入して PBS に対して透析を行った。以上のようにして、精製 shIL-5R  $\alpha$  (蛋白質濃度 400  $\mu$ g/ml、4.5ml) を得た。

一方、hIL-5R  $\alpha$ -Fc は以下のようにして得た。Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を 225cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) に 10%FCS を含むグレイズ・インセクト・メディウム (Grace's Insect Medium、ギブコ社製) 45ml に懸濁し、27°C で 3~4 日間培養した。培養上清を除き新たに 10%FCS を含むグレイズ・インセクト・メディウム 30ml と実施例 1 の 1 (8) で得られたトランスファーベクター pAI297 由来の組み換えウィルスを約  $1 \times 10^7$  PFU/ml の濃度で含む溶液を 1ml 加えた。さ

らに27℃で1日間培養した後、上清を除き新たにSf900-II培地45mlを加え2～3日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し1,500×gで10分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムにプロテインA-セファロース・ゲル約5mlを充填し、50mlのPBSで洗浄を行った。洗浄後上記のhIL-5R  $\alpha$ -Fcを含む培養液450mlを0.5ml/分の流速でプロテインA-セファロースカラムに通塔した。さらに50mlのPBSでカラムを洗浄後、20mlの0.1Mクエン酸緩衝液(pH3.0)を通塔しプロテインA-セファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に1mlずつ溶出液を分画した。各フラクションには0.15mlの2Mトリス-塩酸(pH9.0)を加えてpHを調整した。各フラクションに含まれる蛋白濃度をバイオラッド社製蛋白濃度測定キットを用いて測定し、蛋白濃度の高いフラクションを回収した。該蛋白溶液をアミコン社製セントリコン-30を用いて約3倍に濃縮し、透析用チューブに封入してPBSに対して透析を行った。以上のようにして、精製hIL-5R  $\alpha$ -Fc(蛋白濃度0.4mg/ml、1.8ml)を得た。

#### (11) 大腸菌によるshIL-5R $\alpha$ 部分断片の発現

大腸菌によるshIL-5R  $\alpha$ 部分断片の発現は、以下に示す大腸菌用発現ベクターpMKex1にshIL-5R  $\alpha$ 断片をコードするcDNAを含むDNA断片を挿入してpAI263を造成し、pAI263を大腸菌に導入することにより行った。

プラスミドpGHA2(特開昭60-221091)の3 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液30 $\mu$ lに加え、更に10単位のEcoRIを加えて37℃で4時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿によりDNA断片を回収し、10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液30 $\mu$ lと10単位のClaIを加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、プロモーター領域を含むpGHA2のEcoRI/ClaI断片を約0.3 $\mu$ g回収した。

プラスミドpTerm2(特開平2-227075)の3 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液

30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の EcoRI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、10mM トリスー塩酸 (pH8.4) 、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l と 10 単位の NsiI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、を含む pTerm2 の EcoRI/NsiI 断片を約 0.8  $\mu$ g 回収した。

pGHA2 の EcoRI/ClaI 断片の 50ng、pTerm2 の EcoRI/NsiI 断片の 100ng と配列番号 15 に示した合成 DNA の 100ng とを 20  $\mu$ l の T4DNA リガーゼ緩衝液に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃ で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 12 図に示したプラスミド pMKex1 を得た。

一方、第 3 図 で得られた pAI234 の 3  $\mu$ g を 50mM トリスー塩酸 (pH7.5) 、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の PstI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、20  $\mu$ l の T4DNA ポリメラーゼ I 緩衝液 [33mM トリスー酢酸 (pH8.0) 、66mM 酢酸カリウム、10mM 酢酸マグネシウム、0.5mM DTT 、0.01%BSA からなる緩衝液] に溶解し、5 単位の T4DNA ポリメラーゼ I (宝酒造社製) を加え、12℃ で 15 分間反応させ、PstI 消化によって生じた 5' 突出末端を平滑末端に変えた。さらに該反応液をフェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、20mM トリスー塩酸 (pH8.5) 、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l と 10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、shIL-5R  $\alpha$  断片をコードする cDNA を含む約 0.7kb の DNA 断片を約 0.3  $\mu$ g 回収した。

第 12 図で得られた大腸菌用発現ベクター pMKex1 の 3  $\mu$ g を 20mM トリスー塩酸 (pH8.5) 、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化カリウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に溶解し、10 単位の BamHI を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を回収し、50mM トリスー塩酸

(pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウムおよび1mM DTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に溶解し、更に 10 単位の EcoRV を加えて 37℃で 4 時間反応させた。該反応液よりエタノール沈殿により DNA 断片を約 1.5  $\mu$ g 回収した。

以上のようにして得られた shIL-5R  $\alpha$ 断片をコードする cDNA の 50ng と pMKex1 の EcoRV/BamHI 断片の 100ng とを 20  $\mu$ l の T4DNA リガーゼ緩衝液に溶解し、T4DNA リガーゼ 200 単位を加え、12℃で 16 時間結合反応を行った。このようにして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 13 図に示したプラスミド pA1263 を得た。

上記のプラスミド pA1263 を大腸菌に導入し (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、200  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地 400ml 中で、37℃4 時間培養後、0.5mM の IPTG を添加し、その後さらに 37℃2 時間培養した。培養液 400ml を 3,000  $\times$ g で 15 分間遠心分離し、大腸菌を含む沈殿を 100ml の緩衝液 I [10mM トリス-塩酸 (pH8.0)、1mM EDTA、150mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液] に懸濁した。再び遠心分離後、沈殿を 7ml の緩衝液 I で懸濁し、超音波処理により菌体を破壊する。これを 10,000 $\times$ g で 30 分間遠心分離し、その沈殿を 500  $\mu$ l SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルバッファー [6mM トリス-塩酸 (pH6.8)、2%SDS、10% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液] に溶解し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、分子量約 27kD の精製 shIL-5R  $\alpha$ 断片を得た。

#### (12) ヒト IL-5R $\alpha$ を発現した細胞の細胞膜画分の調製

hIL-5R  $\alpha$ 遺伝子を導入した CTLL-2 細胞 [ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 177, 1523 (1993)]、あるいは対照としての CTLL-2 細胞 [ATCC TIB 214] からの膜成分の調製を以下のようにして行った。

該細胞を遠心分離 (1,200rpm、5分) し、PBS にて 2 回洗浄後、細胞破碎用緩衝液 [20mM HEPES (pH7.4)、1mM EDTA、0.5mM PMSF、250mM シュークロースからなる緩衝液] に懸濁しホモゲナイザーを用いて破碎した。破碎後 5,500rpm で 15 分間遠心分離して沈殿を除き、さらに 35,000rpm で遠心分離して細胞膜画



分を沈殿として回収した。

## 2. 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 1 の 1(9)、1(10)、1(11) あるいは 1(12) より得られた各種抗原 50  $\mu$ g をそれぞれアルミニウムゲル 2mg および百日咳ワクチン（千葉県血清研究所製） $1 \times 10^9$  細胞とともに 5 週令雌 BALB/c マウスあるいは雌 SD ラットに投与し、2 週間後より 50  $\mu$ g の蛋白質を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、その血清抗体価を実施例 1 の 3 に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスあるいはラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。この時、実施例 1 の 1(12) で得られた細胞膜画分を抗原としてマウス 13 匹、ラット 5 匹を免疫したが、抗体価の強い上昇は認められなかった。また、実施例 1 の 1(9) で得られた shIL-5R  $\alpha$  を免疫したラット 5 匹あるいは実施例 1 の 1(10) で得られた shIL-5R  $\alpha$  を免疫したラット 10 匹においても抗体価の十分な上昇は認められなかった。

脾臓を MEM 培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1,200rpm、5 分）した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で 1～2 分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

## 3. 酵素免疫測定法

実施例 1 の 1(9) あるいは 1(10) で得られた shIL-5R  $\alpha$  を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定は、抗原として、実施例 1 の 1(10) の昆虫細胞培養上清より得られた hIL-5R  $\alpha$ -Fc を用いて以下に示す 2 種類の方法にしたがって行った。

(A) 96 ウェルの EIA 用プレート（グライナー社製）に、PBS で 1  $\mu$ g/ml の濃度に希釈した hIL-5R  $\alpha$ -Fc および対照抗原として共通のヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗 GD3 キメラ抗体 KM871 を 50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含む PBS (1%BSA-PBS) を 100  $\mu$ l/ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗

血清およびハイブリドーマの培養上清を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し 2 時間反応させた。tween-PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンあるいは抗ラットイムノグロブリン (DAKO 社製) を 50  $\mu$  l/ウェルで加えて室温、1 時間反応させ、tween-PBS で洗浄後 ABTS 基質液 [2, 2' アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウムの 550mg を 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) 1L に溶解し、使用直前に過酸化水素 1  $\mu$  l/ml を加えた溶液] を用いて発色させ OD415nm の吸光度を測定した (NJ2001; 日本インターメッド社製)。

(B) さらに、IL-5 に対する中和活性を有するモノクローナル抗体をより高い確率で選択する目的で、ビオチン標識したヒト IL-5 と実施例 1 の 1(10)の昆虫細胞培養上清より得られた shIL-5R  $\alpha$ -Fc を利用し、IL-5 の受容体への結合阻害活性を指標としてスクリーニングを以下の手順で行った。なお、ビオチン標識するのに用いたヒト IL-5 は、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ [Journal of Immunological Methods, 125, 233(1989)] に記載された方法により調製した。

ヒト IL-5 のビオチン標識は、ピアース社のビオチン標識用試薬 (Biotin-LC-Hydrazide) に添付されているプロトコールに従い以下の手順で行った。始めに PBS に溶解した 1.6mg/ml のヒト IL-5 を標識用緩衝液 (100mM 酢酸ナトリウム、0.02%NaN<sub>3</sub>、pH5.5) で平衡化した PD10 カラム (ファルマシア社製) に通塔して塩交換を行い、蛋白質濃度の高い画分を 1ml 回収した。該ヒト IL-5 溶液 0.5ml に 30mM メタ過ヨウ素酸を含む標識用緩衝液 1ml を加え、遮光して 30 分間室温にて反応させた。反応終了後、標識用緩衝液で平衡化した PD10 カラムに通塔して未反応のメタ過ヨウ素酸を除き、蛋白質濃度の高い画分を 1.5ml 回収した。ここに前述した 5mM のビオチン標識用試薬を含む標識用緩衝液 20  $\mu$  l を加え、さらに室温にて 1 時間反応させた。反応終了後、反応停止液 (0.1M トリス、pH7.5) を 50  $\mu$  l 加えた後、0.05%NaN<sub>3</sub> を含む PBS にて平衡化した PD10 カラムに通塔して塩交換を行うとともに、未反応の試薬を取り除いた。得られたビオチン標識ヒト IL-5 は 4℃にて保存した。

実施例 1 の 1(10) の昆虫細胞培養上清より得られた shIL-5R  $\alpha$ -Fc を PBS で 5  $\mu$ g/ml の濃度に希釈し、96 ウェルの EIA 用プレート（グライナー社製）に 50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBS にて洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含む PBS (1%BSA-PBS) を 100  $\mu$ l/ウェル加え、室温で 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。さらに tween-PBS にて洗浄後、被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清およびハイブリドーマの培養上清と前述したビオチン標識ヒト IL-5 をそれぞれ 50  $\mu$ l/ウェルずつ分注し、4℃一晩反応させた。翌日 tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS にて 4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン D（ニチレイ社製）を 50  $\mu$ l/ウェルで加えて室温で 1 時間反応させ、tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ l/ウェル加えて発色させ、OD415nm の吸光度を測定した。

また、実施例 1 の 1(11) で得られた hIL-5R  $\alpha$  断片を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定に関しては、抗原として実施例 1 の 1(11) の大腸菌により得られた hIL-5R  $\alpha$  断片を用いた。上記と同様の方法により大腸菌により生産した shIL-5R  $\alpha$  および対照抗原として大腸菌の菌体蛋白を吸着させたプレートを作製し、ハイブリドーマの培養上清および被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清の反応性を検討した。

さらに、実施例 1 の 1(12) で得られた hIL-5R  $\alpha$  を発現した細胞の膜画分を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定に関しては、抗原として実施例 1 の 1(12) で得られた細胞膜画分を用いた。上記と同様の方法により IL-5R  $\alpha$  発現した細胞の膜画分および対照細胞の膜画分を吸着させたプレートを作製し、ハイブリドーマの培養上清および被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清の反応性を検討した。

#### 4. マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3-U1 を正常培地で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### 5. ハイブリドーマの作製

実施例 1 の 2 で得られたマウス脾細胞あるいはラット脾細胞と実施例 1 の 4

で得られた骨髓腫細胞とを 10:1 になるよう混合し、遠心分離 (1,200rpm、5 分) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃ で、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 培地 2ml および DMSO 0.7ml の混液 0.2 ~ 1ml/10<sup>8</sup> マウス脾細胞を加え、1 ~ 2 分間毎に MEM 培地 1 ~ 2ml を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるようにした。遠心分離 (900rpm、5 分) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞を HAT 培地 100ml 中に懸濁した。

この懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$  l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 10~14 日間 CO<sub>2</sub> 5%下で培養した。この培養上清を実施例 1 の 3 に記載した酵素免疫測定法で調べ、昆虫細胞培養上清より調製した hIL-5R  $\alpha$ -Fc、あるいは大腸菌により生産した shIL-5R  $\alpha$  に特異的に反応するウェルを選び、さらに HT 培地と正常培地に換え、2 回クローニングを繰り返して、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株を確立した。

実施例 1 の 1(11) で得られた hIL-5R  $\alpha$  断片を免疫したマウス 6 匹、あるいはラット 8 匹から得られたハイブリドーマ約 4000 クローンをスクリーニングした結果、抗 hIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体を得、これを KM1074 と名付けたが、IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性は、後述する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖モノクローナル抗体 KM1257、KM1259 に比較して極めて弱いものであった。

一方、実施例 1 の 1(9) で得られた shIL-5R  $\alpha$  あるいは実施例 1 の 1(10) を免疫したマウス 15 あるいは 20 匹の中から高い抗体価を示した個体を 12 あるいは 6 匹選択し、ハイブリドーマを作製した。10000 クローン以上のハイブリドーマをスクリーニングし、後述する実施例 3 の 1 に示した方法において hIL-5R  $\alpha$  発現細胞に対する特異的な反応性が認められる 81 クローンの抗 hIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。この中で後述する実施例 3 の 1 に示す免疫細胞染色法において最も強い反応性を示したモノクローナル抗体は、KM1257 であった。ハイブリドーマ KM1257 は FERM BP-5133 として、平成 7 年 6 月 13 日付けで工業技術院微生物工業技術研究所 (日本国茨城県つくば

市東 1 丁目 1 番 3 号、以下、所在住所は同様）に寄託された。また、この 8 1 クローンの中で後述する実施例 3 の 2 で示した IL-5 の生物活性の強い阻害作用を示したものは 6 クローンのみであり、その中でも最も強い阻害活性を示したモノクローナル抗体は、KM1259 および KM1486 であった。ハイブリドーマ KM1259 は FERM BP-5134 として、平成 7 年 6 月 1 3 日付けで、ハイブリドーマ KM1486 は FERM BP-5651 として、平成 8 年 9 月 3 日付けで、それぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された。

モノクローナル抗体 KM1257、KM1259 および KM1486 の反応性を第 14 図に示す。また、抗体クラスはサブクラスタイピングキットを用いた酵素免疫測定法を行った。その結果 KM1257、KM1259 および KM1486 の抗体クラスは、すべて IgG1 であった。

#### 6. モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した 8 週令ヌード雌マウス (Balb/c) に 5 で得られたハイブリドーマ株を  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹それぞれ腹腔内に注射した。10~21 日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1 ~ 8 ml/匹) し、遠心分離 (3,000rpm、5 分) して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

#### 実施例 2. 抗ヒト IL-5R $\alpha$ 鎖ヒト化抗体の製造

##### 1. タンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の構築

ヒト化抗体の VH 及び VL をコードする cDNA を、それぞれヒト抗体 C $\gamma$ 1 をコードする cDNA 及びヒト抗体 C $\kappa$  をコードする cDNA の上流に挿入し、ヒト抗体 IgG1,  $\kappa$  型のヒト化抗体を動物細胞で発現させるためのタンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93 を特開平 2-257891 に記載のプラスミド pSE1UK1SEd 1-3 を基にして以下のようにして構築した。構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用した。

(1) ラビット  $\beta$ -グロビン遺伝子スプライシング、ポリ A シグナルに存在す

### る制限酵素ApaI及びEcoRI部位の改変

ヒト化抗体発現用ベクターにヒト型キメラ抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のV領域を制限酵素NotI-ApaI断片 (VH) 及びEcoRI-SplI断片 (VL) でカセット式に挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターあるいはヒト型CDR移植抗体ヒト化抗体発現ベクターを構築可能とするために、プラスミドpSEIUkISEd1-3のラビットβ-グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルに存在する制限酵素ApaI及びEcoRI部位の改変を以下のようにして行なった。

プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) の3μgを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、ApaI消化によって生じた3' 突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第15図に示したプラスミドpBSAを得た。

さらに得られたプラスミドpBSAの3μgを50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、EcoRI消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第16図に示したプラスミドpBSAEを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSAEの3μgを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液20μlに溶解し、10μlずつに分け、

一つには更に10単位の制限酵素SacII（東洋紡績社製）を加え、もう一つには更に10単位の制限酵素KpnI（宝酒造社製）を加えて各々37℃で1時間反応させた。両反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、各々約2.96kbのHindIII-SacII断片と約2.96kbのKpnI-HindIII断片を約0.3μg回収した。

次に、プラスミドpSE1UK1SEd1-3の3μgを10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素SacII（東洋紡績社製）と10単位の制限酵素KpnI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10μlの10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10μlに溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.42kbのHindIII-SacII断片と約1.98kbのKpnI-HindIII断片を各々約0.2μg回収した。

次に、上記で得られたpSE1UK1SEd1-3のHindIII-SacII断片0.1μgとpBSAEのHindIII-SacII断片0.1μgを全量20μlの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第17図に示したプラスミドpBSH-Sを得た。また、上記で得られたpSE1UK1SEd1-3のKpnI-HindIII断片0.1μgとpBSAEのKpnI-HindIII断片0.1μgを全量20μlの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第18図に示したプラスミドpBSK-Hを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSH-SおよびpBSK-Hの3μgを各々10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。両反応液をエタノール沈殿し、各々DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用い、ApaI消化によって生じた3'突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて連結した。このようにして得られた各々の組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第19図に示したプラス

ミドpBSH-SAおよびpBSK-HAを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSH-SAおよびpBSK-HAの5  $\mu$ gを各々50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に1単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加えて37℃で10分間反応させ、部分消化した。両反応液をエタノール沈殿し、各々DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、EcoRI消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、各々約5.38kbの断片と約4.94kbの断片を約0.5  $\mu$ g回収した。回収した各々の断片0.1  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた各々の組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第20図に示したプラスミドpBSH-SAEおよびpBSK-HAEを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSH-SAEおよびpBSK-HAEの3  $\mu$ gを各々50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。両反応液をエタノール沈殿し、各々DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、EcoRI消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製)を用いて連結した。このようにして得られた各々の組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第21図に示したプラスミドpBSH-SAEEおよびpBSK-HAEEを得た。得られた各プラスミドの10  $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製)に添付の処方に従って反応後、A. L. F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、上記改変によりApaI、EcoRI部位ともに消失したことを確認した。

(2) ラビット $\beta$ -グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルの下流への制限酵素SalI部位の導入

ヒト化抗体発現用ベクターの抗体H鎖、L鎖の発現プロモーターを任意のプロモーターに変換可能とするために、プラスミドpSE1UK1SEd1-3のラビット $\beta$ -グ



ロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルの下流への制限酵素SalI部位の導入を以下のようにして行った。

実施例2の1(1)で得られたプラスミドpBSK-HAEEの3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NaeI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH9.0)、1mM塩化マグネシウムからなる緩衝液20 $\mu$ lに溶解し、更に1単位のアルカリフォスファターゼ (E. coli C75、宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させ、5'末端を脱リン酸化した。更に該反応液をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、10mMトリス-塩酸 (pH8.0)、1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムからなる緩衝液 (以下、TE緩衝液と称す) 20 $\mu$ lに溶解した。該反応液の1 $\mu$ lと0.1 $\mu$ gのリン酸化SalIリンカー (宝酒造社製)を全量が20 $\mu$ lとなるように滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第22図に示したプラスミドpBSK-HAEEsalを得た。得られたプラスミドの10 $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテック社製)に添付の処方に従って反応後、A. L. F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテック社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、ラビット $\beta$ -グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルの下流に一箇所の制限酵素SalI部位が導入されたことを確認した。

(3) ヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ (以下HSVtkと表記) 遺伝子のポリAシグナルに存在する制限酵素ApaI部位の改変

プラスミドpSE1UK1SEd1-3のTn5 カナマイシンフォスホトランスフェラーゼ遺伝子下流のHSVtk遺伝子ポリAシグナルに存在する制限酵素ApaI部位の改変を以下のようにして行った。

実施例2の1(1)で得られたプラスミドpBSAの3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素SacII (東洋紡績社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反

応液をエタノール沈殿し、10  $\mu$ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.96kbのSacII-XhoI断片を約1  $\mu$ g回収した。

次に、プラスミドpSE1UK1SEd1-3の5  $\mu$ gを10  $\mu$ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacII (東洋紡績社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約4.25kbのSacII-XhoI断片を約1  $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpBSAのSacII-XhoI断片0.1  $\mu$ gとpSE1UK1SEd1-3のSacII-XhoI断片を全量20  $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第23図に示したプラスミドpBSX-Sを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSX-Sの3  $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、ApaI消化によって生じた3' 突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第24図に示したプラスミドpBSX-SAを得た。得られたプラスミドの10  $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製)に添付の処方に従って反応後、A. L. F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、HSVtk遺伝子ポリAシグナルの制限酵素ApaI部位が消失したことを確認した。

#### (4) ヒト化抗体L鎖発現ユニットの構築

モロニーマウス白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーの下流にヒト抗体C $\kappa$ をコードするcDNAが存在し、かつヒト型キメラ抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のVLをコードcDNAをカセット式に挿入可能なヒト化抗体L鎖発現ユニットを有するプラスミドpMohC $\kappa$ を以下のようにして構築した。

プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) の3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素SacI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ClaI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、SacIおよびClaI消化によって生じた突出末端を平滑末端に変えた後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.96kbのDNA断片を約1 $\mu$ g回収した。回収したDNA断片0.1 $\mu$ gを全量20 $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第25図に示したプラスミドpBSSCを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSSCの3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.96kbのKpnI-XhoI断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、特開平6-205694に記載のプラスミドpAGE147の5 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該

反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、モロニーマウス白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーを含む約0.66kbのKpnI-XhoI断片を約0.3  $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpBSSCのKpnI-XhoI断片0.1  $\mu$ gとpAGE147のKpnI-XhoI断片0.1  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第26図に示したプラスミドpBSMoを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoの3  $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.62kbのKpnI-HindIII断片を約1  $\mu$ g回収した。

次に、配列番号16、17に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3  $\mu$ gずつを15  $\mu$ lの滅菌水に加え、65℃で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mMDTT]2  $\mu$ lと10mMATP 2  $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製)を加えて37℃で30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpBSMo由来のKpnI-HindIII断片 (3.66kb) 0.1  $\mu$ gとリン酸化合成DNA 0.05  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、

第27図に示したプラスミドpBSMoSを得た。得られたプラスミドの10  $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（ファルマシア バイオテック社製）に添付の処方に従って反応後、A. L. F. DNA Sequencer（ファルマシア バイオテック社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の合成DNAが導入されたことを確認した。

次に、特開平5-304989に記載のプラスミドpChilgLA1の3  $\mu$ gを50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位ずつの制限酵素EcoRI（宝酒造社製）およびEcoRV（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約9.70kbのEcoRI-EcoRV断片を約1  $\mu$ g回収した。次に、配列番号18、19に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機（380A、アプライド バイオシステムズ社製）を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3  $\mu$ gずつを15  $\mu$ lの滅菌水に加え、65℃で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸（pH7.6）、100mM塩化マグネシウム、50mMDTT]2  $\mu$ lと10mMATP 2  $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）を加えて37℃で30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpChilgLA1由来のEcoRI-EcoRV断片（9.70kb）0.1  $\mu$ gとリン酸化合成DNA0.05  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第28図に示したプラスミドpChilgLA1Sを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoSの3  $\mu$ gを20mMトリス-塩酸（pH8.5）、100mM塩化カリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素HpaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.66kbのHpaI-EcoRI断

片を約1  $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpChilgLAISの10  $\mu$ gを20mMトリス-酢酸 (pH7.9)、50mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、1mMDTTおよび100  $\mu$ g/mlBSAからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素NlaIV (ニューイングランド バイオラブズ社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.41kbのNlaIV-EcoRI断片を約0.3  $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpBSMoSのHpaI-EcoRI断片を0.1  $\mu$ gとpChilgLAISのNlaIV-EcoRI断片0.1  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第29図に示したプラスミドpMohC $\kappa$ を得た。

#### (5) ヒト化抗体H鎖発現ユニットの構築

モロニーマウス白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーの下流にヒト抗体C $\gamma$ 1をコードするcDNAが存在し、かつヒト型キメラ抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のVHをコードcDNAをカセット式に挿入可能なヒト化抗体H鎖発現ユニットを有するプラスミドpMohC $\gamma$ 1を以下のようにして構築した。

実施例2の1(4)で得られたプラスミドpBSMoの3  $\mu$ gを50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、30mM酢酸ナトリウム (pH5.0)、100mM塩化ナトリウム、1mM酢酸亜鉛および10%グリセロールからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位のマングベーンヌクレアーゼ (宝酒造社製)を加えて37℃で10分間反応させた。該反応液をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、突出末端を平滑末端

に変えた後、DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第30図に示したプラスミドpBSMoSalを得た。得られたプラスミドの10 $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（ファルマシア バイオテック社製）に添付の処方に従って反応後、A. L. F. DNA Sequencer（ファルマシア バイオテック社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、モロニー Maus 白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーの上流の制限酵素XhoI部位が消失したことを確認した。

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoSalの3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸（pH7.5）、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.66kbのKpnI-HindIII断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、配列番号20、21に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機（380A、アプライド バイオシステムズ社製）を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 $\mu$ gずつを15 $\mu$ lの滅菌水に加え、65℃で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸（pH7.6）、100mM塩化マグネシウム、50mMDTT]2 $\mu$ lと10mMATP 2 $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）を加えて37℃で30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpBSMoSal由来のKpnI-HindIII断片（3.66kb）0.1 $\mu$ gとリン酸化合成DNA0.05 $\mu$ gを全量20 $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第31図に示したプラスミドpBSMoSalSを得た。得られたプラスミドの10 $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（ファルマシア バイオテック社製）に添付の処方に従って反応後、A. L. F. DNA Sequencer（ファルマシア バイオテック社製）

により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の合成DNAが導入されたことを確認した。

次に、特開平5-304989に記載のプラスミドpChilgHB2の10 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素Eco52I (東洋紡績社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、30mM酢酸ナトリウム (pH5.0)、100mM塩化ナトリウム、1mM酢酸亜鉛および10%グリセロールからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位のマングビーンヌクレアーゼ (宝酒造社製)を加えて37℃で10分間反応させた。該反応液をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、突出末端を平滑末端に変えた。エタノール沈殿後、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.99kbのApaI-平滑末端断片を約0.7 $\mu$ g回収した。

次に、プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製)の3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、33mMトリス-酢酸 (pH7.9)、10mM酢酸マグネシウム、66mM酢酸カリウム、0.5mMDTTおよび100 $\mu$ g/mlBSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素SmaI (宝酒造社製)を加えて30℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.0kbのApaI-SmaI断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpChilgHB2のApaI-平滑末端断片0.1 $\mu$ gとpBluescript SK(-)のApaI-SmaI断片0.1 $\mu$ gを全量20 $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第32図に示したプラスミドpBShC $\gamma$ 1を得た。



次に、上記で得られたプラスミドpBShC $\gamma$ 1の5 $\mu$ gを10 $\mu$ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素SpeI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約1.0kbのApaI-SpeI断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoSalSの3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素SpeI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.66kbのApaI-SpeI断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpBShC $\gamma$ 1のApaI-SpeI断片0.1 $\mu$ gとpBSMoSalSのApaI-SpeI断片0.1 $\mu$ gを全量20 $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第33図に示したプラスミドpMohC $\gamma$ 1を得た。

#### (6) タンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の構築

実施例2の1(1)～(5)で得られた各種プラスミドを用いてタンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93を以下のようにして構築した。

実施例2の1(1)で得られたプラスミドpBSH-SAEEの3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素SalI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反

応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約5.42kbのHindIII-SalI断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、実施例2の1(1)で得られたプラスミドpBSK-HAEEの5 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ラビット $\beta$ -グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナル、SV40初期遺伝子ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子プロモーターを含む約1.98kbのKpnI-HindIII断片を約0.8 $\mu$ g回収した。

次に、実施例2の1(5)で得られたプラスミドpMohC $\gamma$ 1の5 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 $\mu$ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素SalI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ヒト化抗体H鎖発現ユニットを含む約1.66kbのKpnI-SalI断片を約0.8 $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpBSH-SAEEのHindIII-SalI断片0.1 $\mu$ g、pBSK-HAEEのKpnI-HindIII断片0.1 $\mu$ gおよびpMohC $\gamma$ 1のKpnI-SalI断片0.1 $\mu$ gを全量20 $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第34図に示したプラスミドpMo $\gamma$ 1SPを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpMo $\gamma$ 1SPの3 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素SalI (宝酒造社製) および制限酵素XhoIを加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約

9. 06kbのSalI-XhoI断片を約1  $\mu$ g回収した。

次に、実施例2の1(2)で得られたプラスミドpBSK-HAEESalの5  $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素SalI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ラビット $\beta$ -グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルを含む約1.37kbのKpnI-SalI断片を約0.7  $\mu$ g回収した。

次に、実施例2の1(4)で得られたプラスミドpMohC $\kappa$ の5  $\mu$ gを10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ヒト化抗体L鎖発現ユニットを含む約1.06kbのKpnI-XhoI断片を約0.7  $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpMo $\gamma$ ISPのSalI-XhoI断片0.1  $\mu$ g、pBSK-HAEESalのKpnI-SalI断片0.1  $\mu$ gおよびpMohC $\kappa$ のKpnI-XhoI断片0.1  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第35図に示したプラスミドpMo $\kappa$  $\gamma$ ISPを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpMo $\kappa$  $\gamma$ ISPの3  $\mu$ gを50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の

制限酵素SacII（東洋紡績社製）を加えて37℃で10分間反応させ、部分消化した。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約8.49kbのSacII-XhoI断片を約0.2  $\mu$ g回収した。

次に、実施例2の1(3)で得られたプラスミドpBSX-SAの3  $\mu$ gを10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素SacII（東洋紡績社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約4.25kbのSacII-XhoI断片を約1  $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたpMo $\kappa$ γ1SPのSacII-XhoI断片0.1  $\mu$ gとpBSX-SAのSacII-XhoI断片0.1  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、第36図に示したプラスミドpKANTEK93を得た。

## 2. 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体をコードするcDNAの単離、解析

(1) 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体生産ハイブリドーマからのmRNAの取得

インビトロジェン社製のmRNA抽出キットであるFast Trackを用い、キットに添付の使用説明書に従って、マウス抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体KM1257、KM1259およびKM1486生産ハイブリドーマ（それぞれFERM BP-5133、FERM BP-5134、FERM BP-5651）の各 $1 \times 10^8$ 細胞より、それぞれmRNAを取得した。

(2) マウス抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体生産ハイブリドーマのH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

実施例2の2(1)で取得したKM1257、KM1259およびKM1486のmRNAの各5  $\mu$ gから、cDNA Synthesis Kit（ファルマシア バイオテック社製）を用い、キットに添付の使用説明書に従って、両端にEcoR I アダプターを有するcDNAをそれぞれ

合成した。作製したそれぞれのcDNAの約6  $\mu$ g を10  $\mu$ lの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG型抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片とL鎖に対応する約1.0kbのcDNA断片をそれぞれ約0.1  $\mu$ g 回収した。次に、それぞれの約1.5kbのcDNA断片0.1  $\mu$ gおよび約1.0kbのcDNA断片0.1  $\mu$ g と、Lambda ZAP11ベクター [Lambda ZAP11ベクターをEcoR Iで切断後、ウシ腸アルカリフォスファターゼ(Calf Intestine Alkaline Phosphatase)で処理したもの：ストラタジーン社製] 1  $\mu$ gをT4リガーゼ緩衝液11.5  $\mu$ lに溶解し、T4 DNAリガーゼ175単位を加えて、12℃にて24時間インキュベートし、さらに室温にて2時間インキュベートした。それぞれの反応液のうち4  $\mu$ lを常法 [モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、2.95、Cold Spring Harbor Laboratory, 1989] に従い、ギガバックゴールド (ストラタジーン社製) を使用してラムダファージにパッケージングし、これらを常法 [モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、2.95-107、Cold Spring Harbor Laboratory, 1989] に従って、ギガバックゴールドに付属の大腸菌株XL1-Blue [バイオテクニクス(Biotechniques), 5, 376 (1987)] に感染させて、KM1257、KM1259およびKM1486のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーとしてそれぞれ約4千個のファージクローンを取得した。

(3) 抗ヒトIL-5R  $\alpha$  鎖モノクローナル抗体生産ハイブリドーマのH鎖およびL鎖をコードするcDNAのクローニング

実施例2の2(2)で作製したそれぞれのファージを常法に従い、ニトロセルロースフィルター上に固定した [モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、2.12、Cold Spring Harbor Laboratory, 1989]。各ニトロセルロースフィルターを用いてECL ダイレクト・ヌクレイック・アシッド・ラベリング・アンド・ディテクション・システムズ (direct nucleic acid labelling and detection systems) (アマシャム社製) に添付の使用説明書に従い、マウス免疫グロブリンのC領域をコードするcDNA {H鎖はマウスC $\gamma$ 1cDNAの断片 [セル(Cell), 18, 559(1979)]、L鎖はマウスC $\kappa$ cDNAの断片 [セル(Cell), 22, 197(1980)]} をプローブとしてそれと強く結合したファージクローンを取得した。次に、Lam

bda ZAPIIベクター（ストラタジーン社製）に添付の使用説明書に従い、ファージクローンをプラスミドpBluescriptSK(-)に変換し、最終的にKM1257のH鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpKM1257HおよびKM1257のL鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpKM1257L、KM1259のH鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpKM1259HおよびKM1259のL鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpKM1259L、KM1486のH鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpKM1486HおよびKM1486のL鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpKM1486Lを取得した。

（４）抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードするcDNAのV領域の塩基配列の決定

実施例2の2(3)で得られた各マウス抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードするcDNAのV領域の塩基配列を、得られたプラスミドの10 $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（ファルマシア バイオテク社製）に添付の処方に従って反応後、A. L. F. DNA Sequencer（ファルマシア バイオテク社製）により電気泳動し、決定した。決定したそれぞれのcDNAの塩基配列より、KM1257、KM1259およびKM1486のH鎖およびL鎖のV領域のアミノ酸配列を決定した。配列番号22にKM1257のH鎖、配列番号23にKM1257のL鎖、配列番号24にKM1259のH鎖、配列番号25にKM1259のL鎖、配列番号26にKM1486のH鎖、配列番号27にKM1486のL鎖のそれぞれのV領域の塩基配列およびアミノ酸配列を示す。

（５）抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖のCDR配列の同定

実施例2の2(4)で決定した各マウス抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖のV領域のアミノ酸配列より、それぞれのH鎖およびL鎖のCDR配列を既知の抗体のV領域のアミノ酸配列〔シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト（Sequences of Proteins of Immunological Interest）, US Dept. Health and Human Services, 1991〕と比較することによって同定した。配列番号28、29および30にKM1257のH鎖のCDR1、2および3、配列番号31、32および33にKM1257のL鎖のCDR1、2および3、配列番号34、35および36にKM1259のH鎖のCDR1、2および3、配列番号37、38および39にKM1259のL鎖のCDR1、2

および3、配列番号40、41および42にKM1486のH鎖のCDR1、2および3、ならびに配列番号43、44および45にKM1486のL鎖のCDR1、2および3のそれぞれのアミノ酸配列を示す。

### 3. 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の製造

ヒトIL-5の生物活性を阻害する活性を有する抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体KM1259に由来する抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体を以下のようにして製造した。

#### (1) 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1259の構築

実施例2の1で構築したヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93および実施例2の2で得られたプラスミドpKM1259HおよびpKM1259Lを用いた抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1259を以下のようにして構築した。

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3 $\mu$ gを10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび1mMDTT からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT、100 $\mu$ g/mlBSA および0.01%トライトン X-100 からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.75kbのApaI-NotI断片を約1 $\mu$ g回収した。次に、プラスミドpKM1259Hの5 $\mu$ gを10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび1mMDTT からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素BamI (東洋紡績社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT、100 $\mu$ g/mlBSA および0.01%トライトン X-100 からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.41kbのBamI-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

次に、配列番号46、47に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機

(380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。得られた合成 DNA の  $0.3 \mu\text{g}$  ずつを  $15 \mu\text{l}$  の滅菌水に加え、 $65^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱した。該反応液を室温にて 30 分間放置した後、10 倍緩衝液 [500mM トリス-塩酸 (pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mMDTT]  $2 \mu\text{l}$  と 10mM ATP  $2 \mu\text{l}$  を加え、更に 10 単位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加えて  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させ、5' 末端をリン酸化した。

上記で得られたヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 由来の ApaI-NotI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  とプラスミド pKM1259H 由来の BanI-NotI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  とリン酸化合成 DNA  $0.05 \mu\text{g}$  を全量  $20 \mu\text{l}$  の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、第 37 図に示したプラスミド pKANTEX1259H を得た。

次に、得られたプラスミド pKANTEX1259H の  $3 \mu\text{g}$  を 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT および  $100 \mu\text{g/ml}$  BSA からなる緩衝液  $10 \mu\text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 SpII (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.20kb の EcoRI-SpII 断片を約  $1 \mu\text{g}$  回収した。

次に、プラスミド pKM1259L の  $5 \mu\text{g}$  を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、50mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT からなる緩衝液  $10 \mu\text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 AvalI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT からなる緩衝液  $10 \mu\text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.38kb の AvalI-EcoRI 断片を約  $0.5 \mu\text{g}$  回収した。

次に、配列番号 48、49 に記載の塩基配列を有する合成 DNA を自動 DNA 合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。得られた合



成 DNA の 0.3  $\mu$ g ずつを 15  $\mu$ l の滅菌水に加え、65℃で 5 分間加熱した。該反応液を室温にて 30 分間放置した後、10 倍緩衝液[500mM トリス-塩酸 (pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mMDTT]2  $\mu$ l と 10mM ATP 2  $\mu$ l を加え、更に 10 単位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加えて 37℃で 30 分間反応させ、5' 末端をリン酸化した。

上記で得られたプラスミド pKANTEX1259H 由来の EcoRI-SplI 断片 0.1  $\mu$ g、プラスミド pKM1259L 由来の AvalI-EcoRI 断片 0.1  $\mu$ g およびリン酸化合成 DNA 0.05  $\mu$ g を全量 20  $\mu$ l の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、第 38 図に示したプラスミド pKANTEX1259 を得た。

(2) pKANTEX1259 を用いた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) での発現

YB2/0 細胞への抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1259 の導入は宮地らの方法に従い、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)] にて行った。

実施例 2 の 3(1) で得られた pKANTEX1259 の 4  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  個の YB2/0 細胞へ導入後、RPMI1640-FCS(10) を 96 ウェルマイクロタイタープレートに 200  $\mu$ l / ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養後、ジェネティシン (以下、G418 と称す、ギブコ社製) を 0.5mg/ml になるように添加してさらに 1~2 週間培養した。G418 耐性を有する形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体の活性を以下に示す ELISA 法 1 あるいは ELISA 法 2 により測定した。

#### ELISA 法 1

実施例 1 の 1(10) の昆虫細胞培養上清より得られた shIL-5R  $\alpha$ -Fc を PBS で 5  $\mu$ g/ml の濃度、あるいはさらに希釈した溶液を調整し、96 ウェルの EIA 用プレート (グライナー社製) に 50  $\mu$ l / ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄

後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS(1%BSA-PBS)を100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清あるいは精製した40 $\mu$ g/mlの各種抗ヒトIL-5R $\alpha$ 抗体を25 $\mu$ l/ウェル、さらに実施例1の3で調製した0.4 $\mu$ g/mlのビオチン標識ヒトIL-5を25 $\mu$ l/ウェル分注し、室温で4時間反応させた。0.05%Tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSにて4000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジンD(ニチレイ社製)を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05%Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウムの550mgを0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)1Lに溶解し、使用直前に過酸化水素1 $\mu$ l/mlを加えた溶液]を50 $\mu$ l/ウェル加えて発色させ、OD415nmの吸光度を測定した。抗体を加えない場合の吸光度の値を阻害率0%とし、抗体のビオチン化標識IL-5に対する阻害率を次式により算出し、各サンプルを評価した。

$$\text{結合阻害率 (\%)} = 100 - \frac{A - C}{B - C} \times 100$$

A: 抗体添加時のOD値

B: 抗体非添加時のOD値

C: ビオチン標識ヒトIL-5非添加時のOD値

## ELISA法2

実施例1の1(10)の昆虫細胞培養上清より得られたshIL-5R $\alpha$ をPBSで2 $\mu$ g/mlの濃度、あるいはさらに希釈した溶液を調整し、96ウェルのEIA用プレート(グライナー社製)に50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS(1%BSA-PBS)を100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清、精製した各種の抗ヒトIL-5R $\alpha$ 抗体を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で2時間反応させた。0.05%Tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSにて500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(アメリカン カレックス社製)

を50  $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05%Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウムの550mgを0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)1Lに溶解し、使用直前に過酸化水素1  $\mu$ l/mlを加えた溶液]を50  $\mu$ l/ウェル加えて発色させ、OD415nmの吸光度を測定した。

培養上清中に抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の活性が認められた形質転換株について、0.5mg/ml G418、50nM MTX(シグマ社製)を含むRPMI1640-FCS(10)培地に懸濁し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、1~2週間培養し、50nM MTX耐性を有する形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の活性を上記のELISA法により測定した。活性の認められた形質転換株については、上記と同様の培養方法により、さらにMTX濃度を100nM、200nMと上げて行き、0.5mg/ml G418、200nM MTX含むRPMI1640-FCS(10)培地で増殖可能でかつ、抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株についてはさらに2回の限界希釈法によるクローニングを経て、最終的な抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株とした。抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の例としてはKM1399(FERM BP-5650)があげられ、それが生産する抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体をKM1399と命名した。形質転換株KM1399はFERM BP-5650として、平成8年9月3日付で、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された。形質転換クローンKM1399の抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体KM1399の生産性は約5  $\mu$ g/10<sup>6</sup>cells/24hrであった。

### (3) 抗ヒトIL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体KM1399の培養上清からの精製

実施例2の3(2)で得られた抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体生産株KM1399を0.5mg/ml G418、200nM MTX含むGIT培地(日本製薬社製)に1~2 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/mlとなるように懸濁し、175cm<sup>2</sup>フラスコ(グライナー社製)に200mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、5~7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。該培養上清約1.0LよりプロセップA(バイオプロセッシング社製)カラムを用いて精製抗ヒトIL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体

KM1399 を約 3mg 取得した。精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 の約 4  $\mu$ g を、公知の方法 [ネイチャー (Nature)、227, 680 (1970)] に従って電気泳動し、分子量を調べた。その結果を第 39 図に示す。第 39 図に示したように、還元条件下では抗体 H 鎖の分子量は約 50 キロダルトン、抗体 L 鎖の分子量は約 25 キロダルトンであり、正しい分子量の H 鎖および L 鎖の発現が確認された。また、非還元条件下では抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 の分子量は約 140 キロダルトンであり、2 本の H 鎖および 2 本の L 鎖からなる正しい大きさのヒト型キメラ抗体の発現が確認された。また、精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 の H 鎖、L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (470A、アプライド バイオシステムズ社製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果、予想される正しいアミノ酸配列が得られた。

(4) 抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性 (ELISA 法 1)

抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖マウス抗体 KM1259 および抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を実施例 2 の 3 (2) に記載の ELISA 法 1 により測定した。その結果を第 40 図に示す。第 40 図に示したように、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 は抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖マウス抗体 KM1259 と同等の強いヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を有していることが示された。

4. COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) を用いた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体の一過性発現

下記で述べる抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体抗の各種バージョンの活性評価をより迅速に行なうために、pKANTEX1259 およびその改変ベクターを用いて COS-7 細胞における抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体の一過性発現をリポフェクトアミン法を用いて以下のようにして行なった。

(1) pKANTEX1259 の改変ベクターの構築

動物細胞における一過性発現の効率は導入された発現ベクターのコピー数に依存していることから、大きさのより小さい発現ベクターの方が発現効率がよいことが考えられた。そこで pKANTEX1259 の抗体発現に影響を及ぼさないと考

えられる領域を欠失させ、より小さな抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体発現ベクター、pT1259 を以下のようにして構築した。

プラスミド pKANTEX1259 の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、50mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mMDTT からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mMDTT からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 MluI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、制限酵素消化によって生じた 5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 9.60kb の DNA 断片を約 1  $\mu$ g 回収した。回収した DNA 断片 0.1  $\mu$ g を全量 20  $\mu$ l の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、第 41 図に示したプラスミド pT1259 を得た。

## (2) pT1259 を用いた抗ヒト IL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の一過性発現

$1 \times 10^5$  細胞/ml の COS-7 細胞を 6 ウエルプレート (ファルコン社製) に 2ml / ウエルずつ分注し、37°C で一晩培養した。100  $\mu$ l の OPTI-MEM 培地 (ギブコ社製) に pT1259 の 2  $\mu$ g を加え、更に 100  $\mu$ l の OPTI-MEM 培地 (ギブコ社製) に 10  $\mu$ l のリポフェクトアミン・リエージェント (LIPOFECTAMINE Reagent, ギブコ社製) を添加した溶液を加え、室温で 40 分間反応させ、DNA-リボソームの複合体を形成させた。前記した COS-7 細胞を 2ml の OPTI-MEM 培地 (ギブコ社製) で 2 回洗浄後、DNA-リボソームの複合体を含む溶液を添加し、37°C で 7 時間培養後、溶液を除去し、10% の FCS を含む DMEM 培地 (ギブコ社製) を 2ml 添加し、37°C で培養した。培養後、72 時間の時点で培養上清を回収し、培養上清中の抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の活性評価を実施例 2 の 3(2)に記載の ELISA 法 1 で行なった。その結果を第 42 図に示す。第 42 図に示したように pT1259 を導入した COS-7 細胞の培養上清中に濃度依存的な活性が見られ、抗ヒト IL-5R

$\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体の発現が確認された。以上の結果より、pKANTEX93の大きさを小さくしたベクターを作製し、COS-7細胞に導入することで一過性発現系で各種発現ベクター由来のヒト化抗体の活性評価を行うことが可能であることが示された。また、後述する各種抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の活性を正確に比較するために、下記 4 (3) に記載の ELISA 法により一過性発現培養上清中の抗体濃度を測定した。

### (3) ELISA 法による一過性発現培養上清中のヒト化抗体濃度の測定

96 ウエルマイクロタイタープレートにヤギ抗ヒト IgG ( $\gamma$ -chain) 抗体 (医学生物学研究所製) を PBS にて 400 倍希釈した溶液を 50  $\mu$  l/ウエルずつ分注し、4℃にて一晩反応させた。抗体溶液を除去後、100  $\mu$  l/ウエルの 1%BSA-PBS で 37℃、1 時間反応させ、残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、これに一過性発現培養上清あるいは精製した抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 を 50  $\mu$  l/ウエル加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、溶液を除去し、0.05%Tween-PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト  $\kappa$  L 鎖抗体 (ザイメット社製) を 1%BSA-PBS にて 500 倍希釈した溶液を 50  $\mu$  l/ウエル加え、室温で 1 時間反応させた。0.05%Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2' アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウムの 550mg を 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) 1L に溶解し、使用直前に過酸化水素 1  $\mu$  l/ml を加えた溶液] を 50  $\mu$  l/ウエル加えて発色させ、OD415nm の吸光度を測定した。

## 5. 抗ヒト IL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の製造

ヒト IL-5 の生物活性を阻害する活性を有するマウス抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体 KM1259 および抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 と同等の活性を有する抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体を以下のようにして製造した。

### (1) 既知のヒト抗体 VH の共通配列を基礎とする抗ヒト IL-5R $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の VH をコードする cDNA の構築

カバットらは [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health

and Human Services, 1991、以下同様]、既知のさまざまなヒト抗体 VH を FR の配列の相同性からサブグループ I~III (HSG I~III) に分類し、各サブグループ毎に共通配列を同定した。そこで、それら共通配列を基礎として抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VH のアミノ酸配列を設計することとした。まず、基礎とする共通配列を選択するために、マウス抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖抗体 KM1259 の VH の FR 配列と、各サブグループのヒト抗体 VH の共通配列の FR 配列との間の相同性を調べた (第 1 表)。

第 1 表

マウス KM1259VH の FR 配列と、各サブグループのヒト抗体 VH の共通配列の FR 配列との間の相同性 (%)

HSGI	HSGII	HSGIII
72.1	50.6	55.2

その結果、サブグループ I と最も相同性が高いことが確認され、サブグループ I の共通配列を基礎として抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VH のアミノ酸配列を設計し、該アミノ酸配列をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下のようにして構築した。

配列番号 50 から 55 の塩基配列を有する合成 DNA を自動 DNA 合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製) を用いて合成した。合成した各 DNA を最終濃度が  $0.1 \mu\text{M}$  となるように  $10\text{mM}$  トリスー塩酸 (pH8.3)、 $50\text{mM}$  塩化カリウム、 $1.5\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $0.001\%$ ゼラチン、 $200 \mu\text{M}$  dNTP、 $0.5 \mu\text{M}$  M13primer RV (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{M}$  M13primer M4 (宝酒造社製) および 2 単位の TaKaRa Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) よりなる緩衝液  $50 \mu\text{l}$  に加え、 $50 \mu\text{l}$  の鉱油で覆い、DNA サーマルサイクラー (PJ480、パーキン エルマー社製) にセットし、 $94^\circ\text{C}$  にて 2 分間、 $55^\circ\text{C}$  にて 2 分間、 $72^\circ\text{C}$  にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。該反応液をエタノール沈殿し、 $20 \mu\text{l}$  の TE 緩衝液に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、約  $0.48\text{kb}$  の増幅断片を約  $0.2 \mu\text{g}$  回収した。

次に、プラスミド pBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) の 3  $\mu$ g を 33mM トリス-酢酸 (pH7.9)、10mM 酢酸マグネシウム、66mM 酢酸カリウム、0.5mM DTT および 100  $\mu$ g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 SmaI (宝酒造社製) を加えて 30℃ で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH9.0)、1mM 塩化マグネシウムからなる緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、更に 1 単位のアルカリフォスファターゼ (E. coli C75、宝酒造社製) を加えて 37℃ で 1 時間反応させ、5' 末端を脱リン酸化した。更に該反応液をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、20  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解した。

次に、上記で得られた PCR 後の増幅断片 0.1  $\mu$ g と pBluescript SK(-) の SmaI 断片 0.1  $\mu$ g 相当を全量 20  $\mu$ l の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換した。形質転換株の 10 個のクローンより各プラスミド DNA を調製し、塩基配列の決定を行なった結果、目的の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VH のアミノ酸配列をコードする cDNA を含む第 43 図に示したプラスミド phKM1259HV0 を得た。phKM1259HV0 に含まれる抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VH (以下 HV.0 と表記) の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号 56 に示した。

(2) 既知のヒト抗体 VL の共通配列を基礎とする抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の VL をコードする cDNA の構築

カバットらは、既知のさまざまなヒト抗体 VL をその FR の配列の相同性からサブグループ I~IV (HSG I~IV) に分類し、各サブグループ毎に共通配列を同定した。そこで、それら共通配列を基礎として抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VL のアミノ酸配列を設計することとした。まず、基礎とする共通配列を選択するために、マウス抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖抗体 KM1259 の VL の FR 配列と、各サブグループのヒト抗体 VL の共通配列の FR 配列との間の相同性を調べた (第 2 表)。



第2表

マウス KM1259VL の FR 配列と、各サブグループのヒト抗体 VL の共通配列の FR 配列との間の相同性 (%)

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
73.8	57.5	60.0	65.0

その結果、サブグループ I と最も相同性が高いことが確認され、サブグループ I の共通配列を基礎として抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VL のアミノ酸配列を設計し、該アミノ酸配列をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下のようにして構築した。

配列番号 57 から 62 の塩基配列を有する合成 DNA を自動 DNA 合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製) を用いて合成した。合成した各 DNA を最終濃度が  $0.1 \mu\text{M}$  となるように  $10\text{mM}$  トリス-塩酸 ( $\text{pH}8.3$ )、 $50\text{mM}$  塩化カリウム、 $1.5\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $0.001\%$ ゼラチン、 $200 \mu\text{M}$  dNTP、 $0.5 \mu\text{M}$  M13primer RV (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{M}$  M13primer M4 (宝酒造社製) および 2 単位の TaKaRa Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) よりなる緩衝液  $50 \mu\text{l}$  に加え、 $50 \mu\text{l}$  の鉍油で覆い、DNA サーマルサイクラー (PJ480、パーキン エルマー社製) にセットし、 $94^\circ\text{C}$  にて 2 分間、 $55^\circ\text{C}$  にて 2 分間、 $72^\circ\text{C}$  にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。該反応液をエタノール沈殿し、 $20 \mu\text{l}$  の TE 緩衝液に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、約  $0.43\text{kb}$  の増幅断片を約  $0.2 \mu\text{g}$  回収した。

次に、上記で得られた PCR 後の増幅断片  $0.1 \mu\text{g}$  と実施例 2 の 5(1) で得られた pBluescript SK(-) の SmaI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  相当を全量  $20 \mu\text{l}$  の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換した。形質転換株の 10 個のクローンより各プラスミド DNA を調製

し、塩基配列の決定を行なった結果、目的の抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VL のアミノ酸配列をコードする cDNA を含む第 44 図に示したプラスミド phKM1259LV0 を得た。phKM1259LV0 に含まれる抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体 VL (以下 LV.0 と表記) の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号 63 に示した。

(3) 既知のヒト抗体 V 領域の共通配列を基礎とした抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクター pKANTEX1259HV0LV0 の構築

実施例 2 の 1 で構築したヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93、実施例 2 の 5(1) で得られたプラスミド phKM1259HV0 および実施例 2 の 5(2) で得られたプラスミド phKM1259LV0 を用いて抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクター pKANTEX1259HV0LV0 を以下のようにして構築した。

プラスミド pKMh1259HV0 の 5  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mM DTT からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100  $\mu$ g/ml BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.44kb の ApaI-NotI 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

次に、実施例 2 の 3(1) で得られたヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 由来の ApaI-NotI 断片 0.1  $\mu$ g と上記で得られたプラスミド phKM1259HV0 由来の ApaI-NotI 断片 0.1  $\mu$ g を全量 20  $\mu$ l の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、第 45 図に示したプラスミド pKANTEX1259HV0 を得た。

次に、得られたプラスミド pKANTEX1259HV0 の 3  $\mu$ g を 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100  $\mu$ g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒

造社製) および制限酵素 *Spl*I (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.20kb の *Eco*RI-*Spl*I 断片を約 1  $\mu$ g 回収した。

次に、プラスミド *phKM1259LV0* の 5  $\mu$ g を 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT および 100  $\mu$ g/ml BSA からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 *Eco*RI (宝酒造社製) および制限酵素 *Spl*I (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.39kb の *Eco*RI-*Spl*I 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

上記で得られたプラスミド *pKANTEX1259HV0* 由来の *Eco*RI-*Spl*I 断片 0.1  $\mu$ g とプラスミド *phKM1259LV0* 由来の *Eco*RI-*Spl*I 断片 0.1  $\mu$ g を全量 20  $\mu$ l の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、第 46 図に示したプラスミド *pKANTEX1259HV0LV0* を得た。

(4) *pKANTEX1259HV0LV0* を用いた既知のヒト抗体 V 領域の共通配列を基礎とした抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) での発現

*pKANTEX1259HV0LV0* を用いて既知のヒト抗体 V 領域の共通配列を基礎とした抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の YB2/0 細胞での発現を実施例 2 の 3(2) に記載の方法に従って行った。

その結果、既知のヒト抗体 V 領域の共通配列を基礎とした抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体を生産する形質転換株としては KM8397 があげられ、それが生産する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体を KM8397 と命名した。形質転換株 KM8397 の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の生産性は約 4  $\mu$ g/10<sup>6</sup> cells/24hr であった。

(5) 抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の培養上清からの精製

実施例 2 の 5(4) で得られた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体生産クロ

ーン KM8397 を実施例 2 の 3 (3) に記載の方法に従い培養、精製し、KM8397 を約 2mg 取得した。精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の約 4  $\mu$ g を、実施例 2 の 3 (3) に記載の方法に従い電気泳動し、分子量を調べた。その結果を第 47 図に示す。第 47 図に示したように、還元条件下では抗体 H 鎖の分子量は約 50 キロダルトン、抗体 L 鎖の分子量は約 25 キロダルトンであり、正しい分子量の H 鎖および L 鎖の発現が確認された。また、非還元条件下では抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の分子量は約 140 キロダルトンであり、2 本の H 鎖および 2 本の L 鎖からなる正しい大きさのヒト型 CDR 移植抗体の発現が確認された。また、精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖 CDR 移植抗体 KM8397 の H 鎖、L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (470A、アプライド バイオシステムズ社製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果、予想される正しいアミノ酸配列が得られた。

(6) 抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性 (ELISA 法 2)

抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 および抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を実施例 2 の 3 (2) に記載の ELISA 法 2 により測定した。その結果を第 48 図に示す。第 48 図に示したように、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 は抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 に比べ、ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対して約 1/2 の反応性を有していることが示された。

6. 抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の V 領域のアミノ酸配列の改変による活性の上昇

実施例 2 の 5 で製造した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性は抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 に比べ、約 1/2 に低下した。そこで、KM8397 の V 領域のアミノ酸配列の改変による活性の上昇を以下のような方法で行った。

(1) 抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の VH のアミノ酸配列の改変  
配列番号 56 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の VH のア

ミノ酸を変異させ、各種改変バージョンの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の VH を作製した。変異させるアミノ酸としては抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖マウス抗体 KM1259 の V 領域のコンピューター三次元構造モデルを参考にし、かつランダムに選択した。変異の導入方法としては変異導入プライマーを用いて実施例 2 の 5 項 (1) に記載の方法を行い、目的の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョンの VH をコードする cDNA を含むプラスミドを得た。

実際には、変異導入プライマーとして配列番号 64 に示した配列を用い、配列番号 50、51、52、53、64、55 の塩基配列を有する合成 DNA を用いて実施例 2 の 5 (1) に記載の方法を行うことにより配列番号 65 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョン 1 の VH (以下 HV. 1 と表記) をコードする cDNA を含むプラスミド phKM1259HV1 を得た。HV. 1 のアミノ酸配列においてはマウス抗体およびヒト型キメラ抗体で認められたヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を保持する目的で、配列番号 56 の FR 中の 95 位のチロシン、97 位のアラニンの各アミノ酸をマウス抗体 KM1259H 鎖 V 領域に見いだされるアミノ酸であるロイシン、グリシンにそれぞれ変えている。

また、変異導入プライマーとして配列番号 64、66、67 に示した配列を用い、配列番号 50、51、66、67、64、55 の塩基配列を有する合成 DNA を用いて実施例 2 の 5 (1) に記載の方法を行うことにより配列番号 68 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョン 2 の VH (以下 HV. 2 と表記) をコードする cDNA を含むプラスミド phKM1259HV2 を得た。HV. 2 のアミノ酸配列においてはモノクローナル抗体およびヒト型キメラ抗体で認められたヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を保持する目的で、配列番号 56 の FR 中の 46 位のグルタミン酸、74 位のスレオニン、95 位のチロシン、97 位のアラニンの各アミノ酸をマウス抗体 KM1259H 鎖 V 領域に見いだされるアミノ酸であるアラニン、アルギニン、ロイシン、グリシンにそれぞれ変えている。

また、変異導入プライマーとして配列番号 69、70、71 に示した配列を用い、配列番号 50、51、69、70、71、55 の塩基配列を有する合成 DNA を用いて実施例 2 の 5 (1) に記載の方法を行うことにより配列番号 72 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$

鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョン 3 の VH (以下 HV. 3 と表記) をコードする cDNA を含むプラスミド phKM1259HV3 を得た。HV. 3 のアミノ酸配列においてはマウス抗体およびヒト型キメラ抗体で認められたヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を保持する目的で、配列番号 56 の FR 中の 40 位のアラニン、46 位のグルタミン酸、67 位のアルギニン、72 位のアラニン、74 位のスレオニン、79 位のアラニン、95 位のチロシン、97 位のアラニンの各アミノ酸をマウス抗体 KM1259H 鎖 V 領域に見いだされるアミノ酸であるアルギニン、アラニン、リジン、セリン、アルギニン、バリン、ロイシン、グリシンにそれぞれ変えている。

結果として、HV. 0、HV. 1、HV. 2、HV. 3 とバージョンが進むにつれて改変に伴うマウス抗体由来のアミノ酸の数が増加するようになっている。

(2) 抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の VL のアミノ酸配列の改変  
配列番号 63 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 の VL のアミノ酸を変異させ、各種改変バージョンの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の VL を作製した。変異させるアミノ酸としては抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖抗体 KM1259 の V 領域のコンピューター三次元構造モデルを参考にし、かつランダムに選択した。変異の導入方法としては変異導入プライマーを用いて実施例 2 の 5 (1) に記載の方法を行い、目的の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョンの VL をコードする cDNA を含むプラスミドを得た。

実際には、変異導入プライマーとして配列番号 73、74、75 に示した配列を用い、配列番号 57、58、73、74、61、75 の塩基配列を有する合成 DNA を用いて実施例 2 の 5 (1) に記載の方法を行うことにより配列番号 76 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョン 1 の VL (以下 LV. 1 と表記) をコードする cDNA を含むプラスミド phKM1259LV1 を得た。LV. 1 のアミノ酸配列においてはモノクローナル抗体およびヒト型キメラ抗体で認められたヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を保持する目的で、配列番号 63 の FR 中の 37 位のグルタミン、45 位のリジン、98 位のフェニルアラニンの各アミノ酸をモノクローナル抗体 KM1259L 鎖 V 領域に見いだされるアミノ酸であるアルギニン、グルタミン酸、バリンにそれぞれ変えている。

また、変異導入プライマーとして配列番号 74、75、77、78 に示した配列を用い、配列番号 57、58、77、74、78、75 の塩基配列を有する合成 DNA を用いて実施例 2 の 5(1)に記載の方法を行うことにより配列番号 79 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョン 2 の VL (以下 LV. 2 と表記) をコードする cDNA を含むプラスミド phKM1259LV2 を得た。LV. 2 のアミノ酸配列においてはモノクローナル抗体およびヒト型キメラ抗体で認められたヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖に対する反応性を保持する目的で、配列番号 63 の FR 中の 22 位のスレオニン、37 位のグルタミン、45 位のリジン、77 位のセリン、98 位のフェニルアラニンの各アミノ酸をモノクローナル抗体 KM1259L 鎖 V 領域に見いだされるアミノ酸であるグリシン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、バリンにそれぞれ変えている。

また、変異導入プライマーとして配列番号 74、80、81、82、83 に示した配列を用い、配列番号 57、80、81、74、82、83 の塩基配列を有する合成 DNA を用いて 5(1)に記載の方法を行うことにより配列番号 84 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョン 3 の VL (以下 LV. 3 と表記) をコードする cDNA を含むプラスミド phKM1259LV3 を得た。LV. 3 のアミノ酸配列においてはモノクローナル抗体およびヒト型キメラ抗体で認められたヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖に対する反応性を保持する目的で、配列番号 63 の FR 中の 7 位のセリン、8 位のプロリン、22 位のスレオニン、37 位のグルタミン、38 位のグルタミン、45 位のリジン、77 位のセリン、87 位のチロシン、98 位のフェニルアラニンの各アミノ酸をモノクローナル抗体 KM1259L 鎖 V 領域に見いだされるアミノ酸であるアラニン、スレオニン、グリシン、アルギニン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、フェニルアラニン、バリンにそれぞれ変えている。

また、変異導入プライマーとして配列番号 80、83、85、86、87 に示した配列を用い、配列番号 57、80、85、86、87、83 の塩基配列を有する合成 DNA を用いて実施例 2 の 5(1)に記載の方法を行うことにより配列番号 88 に示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の改変バージョン 4 の VL (以下 LV. 4 と表記) をコードする cDNA を含むプラスミド phKM1259LV4 を得た。LV. 4 のアミノ酸配列に

においてはモノクローナル抗体抗体およびヒト型キメラ抗体で認められたヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を保持する目的で、配列番号 63 の FR 中の 7 位のセリン、8 位のプロリン、22 位のスレオニン、37 位のグルタミン、38 位のグルタミン、44 位のプロリン、45 位のリジン、71 位のフェニルアラニン、77 位のセリン、87 位のチロシン、98 位のフェニルアラニンの各アミノ酸をマウス抗体 KM1259L 鎖 V 領域に見いだされるアミノ酸であるアラニン、スレオニン、グリシン、アルギニン、リジン、バリン、グルタミン酸、チロシン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、バリンにそれぞれ変えている。

結果として、LV. 0、LV. 1、LV. 2、LV. 3、LV. 4 とバージョンが進むにつれて改変に伴うモノクローナル抗体由来のアミノ酸の数が増加するようになっている。

(3) 各種改変バージョンの V 領域を有する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の製造

実施例 2 の 1 で構築したヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と実施例 2 の 5(1) および (2) で得られた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の各種改変バージョンの V 領域をコードする cDNA を含む各種プラスミドを用いて実施例 2 の 5(3) に記載の方法に従い、各種改変バージョンの V 領域を有する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターで用いた各種改変バージョンの V 領域の組合せおよび発現ベクターの名称を第 3 表に示す。

第 3 表

VL \ VH	HV. 0	HV. 1	HV. 2	HV. 3
LV. 0	pKANTEX1259HV0LV0	pKANTEX1259HV1LV0	pKANTEX1259HV2LV0	pKANTEX1259HV3LV0
LV. 1	pKANTEX1259HV0LV1	pKANTEX1259HV1LV1	pKANTEX1259HV2LV1	
LV. 2	pKANTEX1259HV0LV2	pKANTEX1259HV1LV2	pKANTEX1259HV2LV2	
LV. 3	pKANTEX1259HV0LV3	pKANTEX1259HV1LV3	pKANTEX1259HV2LV3	pKANTEX1259HV3LV3
LV. 4	pKANTEX1259HV0LV4	pKANTEX1259HV1LV4	pKANTEX1259HV2LV4	pKANTEX1259HV3LV4



上記発現ベクターのうち、pKANTEX1259HV0LV0、pKANTEX1259HV1LV0、pKANTEX1259HV2LV0、pKANTEX1259HV0LV1、pKANTEX1259HV1LV1、pKANTEX1259HV2LV1、pKANTEX1259HV0LV2、pKANTEX1259HV1LV2、pKANTEX1259HV2LV2、pKANTEX1259HV0LV3、pKANTEX1259HV1LV3、pKANTEX1259HV2LV3 および pKANTEX1259HV3LV3 の計 13 種類を実施例 2 の 4(1)に記載の方法に従って一過性発現用のベクターに改変した。それら一過性発現用ベクターを用いて実施例 2 の 4(2)に記載の方法に従い、各種改変バージョンの V 領域を有する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の一過性発現を行った。コントロールとして同時に抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 の一過性発現を行った。培養上清中のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する結合活性を実施例 2 の 3(2)に記載の ELISA 法 1 により測定し、また、培養上清中の抗体濃度を実施例 2 の 4(3)に記載の ELISA 法により測定し、両者の値より各種改変バージョンの V 領域を有する抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の活性をヒト型キメラ抗体 KM1399 の活性を 100 としたときの相対活性値で第 49 図に示した。なお、図中では各種改変バージョンの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体は VH と VL の組合せで表示した。第 49 図より VH に関しては HV. 0、HV. 1、HV. 2、HV. 3 と改変が進むにつれて活性が高くなる傾向が認められ、VL に関しては LV. 0、LV. 3 で活性が高く、LV. 1、LV. 2 ではむしろ活性が低下する傾向が認められた。そこで、LV. 0 と各種改変 VH、LV. 3 と HV. 0、LV. 3 と HV. 3、LV. 3 をさらに改変した LV. 4 と各種改変 VH、の組合せの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体について精製抗体を用いたより正確な活性評価を以下のような方法で行った。

上記で述べた計 10 種類の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクター、すなわち pKANTEX1259HV0LV0、pKANTEX1259HV1LV0、pKANTEX1259HV2LV0、pKANTEX1259HV3LV0、pKANTEX1259HV0LV3、pKANTEX1259HV3LV3、pKANTEX1259HV0LV4、pKANTEX1259HV1LV4、pKANTEX1259HV2LV4 および

pKANTEX1259HV3LV4 を用いて実施例 2 の 3(2)に記載の方法に従い YB2/0 細胞での発現を行い、各種の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体を 2~4  $\mu$ g/ $10^6$ cells/24hr の生産性で生産する形質転換株を得た。得られた各種の抗ヒト

IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体を生産する株を実施例 2 の 3 (3) に記載の方法に従い培養、精製し、各種の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体を 1~2mg 取得した。各種の精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の約 4  $\mu$ g を、実施例 2 の 3 (3) に記載の方法に従い電気泳動し、分子量を調べた。その結果、いずれの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体とも還元条件下では抗体 H 鎖の分子量は約 50 キロダルトン、抗体 L 鎖の分子量は約 25 キロダルトンであり、正しい分子量の H 鎖および L 鎖の発現が確認された。また、非還元条件下ではいずれの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体も分子量は約 140 キロダルトンであり、2 本の H 鎖および 2 本の L 鎖からなる正しい大きさのヒト型 CDR 移植抗体の発現が確認された。また、各種の精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖 CDR 移植抗体の H 鎖、L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (470A、アプライド バイオシステムズ社製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果、いずれも予想される正しいアミノ酸配列が得られた。

上記で得られた各種の精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を実施例 2 の 3 (2) に記載の ELISA 法 2 により測定した結果を第 50 図に示した。なお、図中では各種改変バージョンの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体は VH と VL の組合せで表示した。第 50 図に示したように 10 種類の精製抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体のうち、HV. 3LV. 0 および HV. 3LV. 4 が抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 と同等の強さのヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を有していることが示された。

抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 と同等の強さのヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を示した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 HV. 3LV. 0 および HV. 3LV. 4 のアミノ酸配列を比較すると、HV についてはどちらも HV. 3 に示すアミノ酸配列を有するが、VL は LV. 0 と LV. 4 に示すアミノ酸配列である。LV. 0 が CDR を単純にヒト抗体の FR に移植した配列であるのに対して、LV. 4 は活性を高めるためにヒト抗体の FR の 11 残基のアミノ酸をモノクローナル抗体に見出されるアミノ酸に改変した配列である。しかし、第 50 図の結果から実際はアミノ酸残基の改変が活性の上昇にはほとんど寄与していない。これらの事実から、

抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 と同等の強さのヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖に対する反応性を有し、かつモノクローナル抗体由来のアミノ酸が少なくヒトに対する抗原性が低下することが期待される HV. 3LV. 0 を抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体とした。HV. 3LV. 0 は KM8399 と命名し、KM8399 を生産する形質転換株 KM8399 は FERM BP-5648 として、平成 8 年 9 月 3 日 付で、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された。

抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8399 の製造にあたっては、他のヒト型 CDR 移植抗体の製造と同様に、もととなる抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖モノクローナル抗体 KM1259 の CDR のみを単純にヒト抗体の FR に移植した抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8397 ではその活性がモノクローナル抗体 KM1259 の約 1/2 に低下してしまった。そこで上記のように H 鎖、L 鎖の V 領域の FR のいくつかのアミノ酸をモノクローナル抗体 KM1259 に見出されるアミノ酸に改変し、活性の上昇を検討した。改変の過程で VH に関しては改変に従い活性が上昇したが、一方、VL に関しては少数のアミノ酸残基の改変では、むしろ活性が低下し、改変残基数を増加させることにより活性は上昇するが、それは改変しない VL と同程度レベルまでしか上昇しないという結果が得られた。この原因についてはより詳細な解析 (X 線結晶解析等) を待たねばならないが、恐らく抗体の VH と VL の相互作用が関与しており、その結果は用いる個々の抗体で異なることが考えられる。こうした問題から現在でもすべての抗体に適応可能で効率的なヒト型 CDR 移植抗体の製造法は確立されておらず、本実施例のような試行錯誤が必要である。そして、こうした試行錯誤の積み重ねにより、より効率的なヒト型 CDR 移植抗体の製造法が確立されることが考えられる。本実施例は、はじめての抗ヒト IL-5R  $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の製造の例であり、効率的なヒト型 CDR 移植抗体の製造における示唆を与えるものである。

#### 7. ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R $\alpha$ 鎖ヒト化抗体の製造

(1) ヒト抗体 IgG4 サブクラスの C 領域 (C $\gamma$ 4) をコードする cDNA の単離、解析

健康人末梢血 200ml より抗 CD19 抗体がコーティングされたダイナビーズ

(DYNABEADS M-450 Pan-B(CD19) : 日本ダイナル社製) および DETACHaBEAD (日本ダイナル社製) を用い、添付の使用説明書に従って  $1.1 \times 10^7$  個の B 細胞を分離した。分離した細胞より QuickPrep mRNA Purification Kit (ファルマシア バイオテク社製) を用い、キットに添付の使用説明書に従って mRNA を取得した。取得した mRNA の全量から TimeSaver cDNA Synthesis Kit (ファルマシア バイオテク社製) を用い、キットに添付の使用説明書に従って cDNA を合成した。得られた cDNA の全量を用いて、配列番号 89、90 に示したヒト抗体 C $\gamma$ 4 のをコードする cDNA の 5' 側と 3' 側に相同性を持つ配列 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acid Research), 14, 1789(1986)] の合成 DNA をプライマーとして実施例 2 の 5 (1) に記載の PCR を行った。PCR に用いた 5' 側と 3' 側のプライマーはその 5' 端にそれぞれ制限酵素 ApaI と BamHI の認識配列を有しており、得られた cDNA をヒト化抗体発現ベクターに容易に挿入できるように設計した。PCR 後の反応液を QIAquick PCR Purification Kit (キアジェン社製) を用いて精製後、10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mMDTT からなる緩衝液 30  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、100mM 塩化カリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 BamHI (宝酒造社製) を加えて 30℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 1.0kb の ApaI-BamHI 断片を約 0.5  $\mu$ g 回収した。

次に、プラスミド pBluescriptSK(-) (ストラタジーン社製) の 3  $\mu$ g を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mMDTT からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、100mM 塩化カリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT からなる緩衝液 10  $\mu$ l に加え、更に 10 単位の制限酵素 BamHI (宝酒造社製) を加えて 30℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 3.0kb の ApaI-BamHI 断片を約 2  $\mu$ g 回収した。

上記で得られた PCR 増幅断片の ApaI-BamHI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  と pBluescriptSK(-) の ApaI-BamHI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  を全量  $20 \mu\text{l}$  の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア パイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換した。形質転換株の 10 個のクローンより各プラスミド DNA を調製し、塩基配列の決定を行なった結果、目的のヒト抗体 C $\gamma$ 4 をコードする cDNA を含む第 51 図に示したプラスミド pBShC $\gamma$ 4 を得た。

## (2) ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R $\alpha$ 鎖ヒト化抗体の発現ベクターの構築

実施例 2 の 7 (1) で得られたヒト抗体 C $\gamma$ 4 をコードする cDNA を含むプラスミド pBShC $\gamma$ 4 および実施例 2 の 3 (1) で得られた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 の発現ベクター pKANTEX1259 および実施例 2 の 6 (3) で得られた抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8399 の発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 を用いて、ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体の発現ベクターを以下のようにして構築した。

ヒト抗体 C $\gamma$ 4 をコードする cDNA を含むプラスミド pBShC $\gamma$ 4 の  $4 \mu\text{g}$  を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mMDTT からなる緩衝液  $10 \mu\text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、100mM 塩化カリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT からなる緩衝液  $10 \mu\text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 BamHI (宝酒造社製) を加えて 30℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 1.0kb の ApaI-BamHI 断片を約  $1 \mu\text{g}$  回収した。

次に、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399 の発現ベクター pKANTEX1259 および抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8399 の発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 の各  $3 \mu\text{g}$  を 10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび 1mMDTT からなる緩衝液  $10 \mu\text{l}$  に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 1 時間反応させた。各反応液をエタノール沈殿

し、20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、100mM 塩化カリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mMDTT からなる緩衝液 10  $\mu$  l に加え、更に 10 単位の制限酵素 BamHI (宝酒造社製) を加えて 30℃ で 1 時間反応させた。各反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、それぞれ約 12.59kb の ApaI-BamHI 断片を約 2  $\mu$  g 回収した。

上記で得られたプラスミド pBShC  $\gamma$  4 由来の ApaI-BamHI 断片 0.1  $\mu$  g とプラスミド pKANTEX1259 由来の ApaI-BamHI 断片 0.1  $\mu$  g、また、プラスミド pBShC  $\gamma$  4 由来の ApaI-BamHI 断片 0.1  $\mu$  g とプラスミド pKANTEX1259HV3LV0 由来の ApaI-BamHI 断片 0.1  $\mu$  g をそれぞれ全量 20  $\mu$  l の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製) を用いて連結した。このようにして得られた各組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換し、第 52 図に示した IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体の発現ベクター pKANTEX1259  $\gamma$  4 および IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0  $\gamma$  4 を得た。

(3) ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) での発現

実施例 2 の 7(2) で得られた IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体の発現ベクター pKANTEX1259  $\gamma$  4 および IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体の発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0  $\gamma$  4 を用いてヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体の YB2/0 細胞での発現を実施例 2 の 3(2) に記載の方法に従い行った。

その結果、IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株としては KM7399 (FERM BP-5649) が得られ、それが生産する IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体を KM7399 と命名した。KM7399 を生産する形質転換株 KM7399 は FERM BP-5649 として平成 8 年 9 月 3 日 付で、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された。形質転換株 KM7399 の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM7399 の生産性は約 3  $\mu$  g/10<sup>6</sup> cells/24hr であった。

また、IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体を生産する形質転換株としては KM9399 (FERM BP-5647) が得られ、それが生産する IgG4 サブク

ラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体を KM9399 と命名した。形質転換株 KM9399 の抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM9399 の生産性は約  $7 \mu\text{g}/10^6\text{cells}/24\text{hr}$  であった。KM9399 を生産する形質転換株 KM9399 は FERM BP-5647 として平成 8 年 9 月 3 日 付で、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された。

(4) ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体の培養上清からの精製

実施例 2 の 7 (3) で得られた IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体生産株 KM7399 および IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体生産株 KM9399 を実施例 2 の 3 (3) に記載の方法に従い培養、精製し、KM7399、KM9399 をそれぞれ約 1mg、5mg 取得した。精製した IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体 KM7399、KM9399 の各約  $4 \mu\text{g}$  を、実施例 2 の 3 (3) に記載の方法に従い電気泳動し、分子量を調べた。その結果を第 53 図に示す。第 53 図に示したように、還元条件下では各抗体 H 鎖の分子量は約 50 キロダルトン、抗体 L 鎖の分子量は約 25 キロダルトンであり、正しい分子量の H 鎖および L 鎖の発現が確認された。また、非還元条件下では各抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体の分子量は約 140 キロダルトンであり、2 本の H 鎖および 2 本の L 鎖からなる正しい大きさのヒト型 CDR 移植抗体の発現が確認された。また、精製した IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体 KM7399 および KM9399 の H 鎖、L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (470A、アプライド バイオシステムズ社製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果、予想される正しいアミノ酸配列が得られた。

(5) ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性 (ELISA 法 2)

ヒト抗体 IgG1 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM1399、ヒト抗体 IgG1 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM8399、IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型キメラ抗体 KM7399 および IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 KM9399 のヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性

を実施例 2 の 3 (2) に記載の ELISA 法 2 により測定した。その結果を第 54 図に示す。第 54 図に示したように、ヒト抗体 IgG4 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体はヒト抗体 IgG1 サブクラスの抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖ヒト化抗体と同等の強さのヒト IL-5R  $\alpha$  鎖に対する反応性を有していることが示された。

### 実施例 3.

#### 1. 抗 hIL-5R $\alpha$ 抗体の特異性の確認

抗 hIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体および抗 hIL-5R  $\alpha$  ヒト化抗体の特異性を免疫細胞染色を用いて以下の手順に従い確認した。

CTLL-2 細胞 (ATCC TIB 214) にヒト IL-5R 遺伝子を導入した細胞 [以下、CTLL-2 (h5R) 細胞と称す] [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.), 177, 1523 (1993)]、あるいは対照として CTLL-2 細胞  $5 \times 10^5$  個を免疫細胞染色用緩衝液 (1%BSA、0.02%EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS) に懸濁して丸底 96 ウェルプレートに  $100 \mu\text{l}$  /ウェルで分注した。4℃、 $350 \times g$  で 1 分間遠心分離後、上清を除き、 $10 \mu\text{g/ml}$  hIL-5R  $\alpha$  抗体を含む免疫細胞染色用緩衝液  $50 \mu\text{l}$  を加えて 4℃で 30 分間反応させた。反応後、免疫細胞染色用緩衝液を  $200 \mu\text{l}$  /ウェルで加え 4℃、 $350 \times g$  で 1 分間遠心分離後上清を除き細胞の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに 2 回行った後、染色バッファーで 30 倍希釈した FITC 標識抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは FITC 標識抗ヒトイムノグロブリン抗体 (いずれも和光純薬社製) を含む免疫細胞染色用緩衝液  $50 \mu\text{l}$  を加えて 4℃で 30 分間反応させた。反応後、上記と同様の洗浄操作を 3 回行った後フローサイトメーター (コールター社製) を用いて解析を行った。

結果を第 55 図に示す。モノクローナル抗体 KM1257、KM1259 および KM1486、ならびにヒト化抗体 KM1399、KM7399、KM8399 および KM9399 とともに CTLL-2 細胞には反応せず CTLL-2 (h5R) 細胞に特異的に反応した。この結果、モノクローナル抗体 KM1257、KM1259 および KM1486、ならびにヒト化抗体 KM1399、KM7399、KM8399 および KM9399 は hIL-5R  $\alpha$  を特異的に認識することが明らかとなった。



## 2. 抗 IL-5R $\alpha$ 抗体による IL-5 の生物活性の阻害作用

CTLL-2 (h5R) 細胞はヒト IL-5 に依存して増殖応答を示す[ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.), 177, 1523(1993)]ことから、得られた抗 IL-5R  $\alpha$  抗体の CTLL-2 (h5R) 細胞におけるヒト IL-5 依存性細胞増殖に対する影響を検討した。細胞増殖は、セルカウンティングキット（同仁化学研究所製）を用いて発色法にて評価を行った。

CTLL-2 (h5R) 細胞  $1 \times 10^4$  個を  $50 \mu\text{l}$  の正常培地に懸濁して 96 ウェル培養用プレートに分注した。これに正常培地で希釈した  $40 \mu\text{g/ml}$  各種抗 IL-5R  $\alpha$  抗体溶液  $25 \mu\text{l}$ /ウェル、さらに実施例 1 の 3 の方法で調製した  $0.4\text{ng/ml}$  ヒト IL-5 を含む正常培地  $25 \mu\text{l}$ /ウェルを混合し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター中、 $37^\circ\text{C}$  で 44 時間培養した。さらに、セルカウンティングキット溶液を  $10 \mu\text{l}$ /ウェルで加えてから  $\text{CO}_2$  5% 気流下、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間培養した。培養終了後、 $450\text{nm}$  の吸光度をマイクロウェルプレートリーダー Emax（モレキュラーデバイス社製）にて測定した。各抗体の CTLL-2 (h5R) 細胞増殖抑制活性を次式により算出した。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = 100 - \frac{A - C}{B - C} \times 100$$

A: 抗体添加時の OD 値

B: 抗体非添加時の OD 値

C: ヒト IL-5 非添加時の OD 値

結果を第 5 6 図に示すが、モノクローナル抗体 KM1259 および KM1486、ならびにヒト化抗体 KM1399、KM7399、KM8399 および KM9399 はいずれも CTLL-2 (h5R) 細胞のヒト IL-5 依存性増殖を阻害したが、モノクローナル抗体 KM1257 にはこのような活性が認められなかった。

## 3. ヒト好酸球の免疫細胞染色

正常人血液より多形核白血球画分を調製し、3 日間ヒト IL-5 の存在下で培養し好酸球を濃縮した後に、フローサイトメーターを用いて抗 hIL-5R  $\alpha$  モノクロー

ーナル抗体の反応性を検討した。

15ml 容量のポリプロピレン製遠心管にポリモルフプレップ (polymorphprep、ニコメッド社製) を 4ml ずつ 8 本に分注しそれぞれにヘパリン処理をした正常人血 6 ml を重層した。これを  $500 \times g$ 、室温で 30 分間遠心分離して多形核白血球を分離、回収した。多形核白血球が  $1.25 \times 10^7$  個/10ml となるように正常培地に懸濁し、細胞培養用ディッシュ 4 枚に 10ml ずつ分注し、最終濃度が 2ng/ml となるようにヒト IL-5 を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 3 日間培養した。培養終了後細胞を遠心分離 (1,200rpm、5 分) し、免疫細胞染色用緩衝液で  $5 \times 10^6$  個/ml になるように細胞を懸濁し、 $5 \times 10^5$  個を丸底 96 ウェルプレートに分注した。4℃、 $350 \times g$  で 1 分間遠心分離後上清を除き、公知の方法 (酵素抗体法：学際企画刊 1985 年) でビオチン標識したモノクローナル抗体 KM1259 あるいは対照としてビオチン標識した抗ヒト顆粒球コロニー刺激因子モノクローナル抗体 KM341 [アグリカルチュラル・アンド・バイオリジカル・ケミストリー (Agr. Biol. Chem.), 53, 1095 (1989)] を  $10 \mu g/ml$  の濃度で 10% 正常マウス血清を含む免疫細胞染色用緩衝液  $50 \mu l$  を加えて 4℃で 30 分間反応させた。反応後、免疫細胞染色用緩衝液を  $200 \mu l$  /ウェルに加え 4℃、 $350 \times g$  で 1 分間遠心分離後上清を除き細胞の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに 2 回行った後、免疫細胞染色用緩衝液で 10 倍に希釈したフィコエリスリン標識ストレプトアビジン (ベクトン・ディッキンソン社製) を  $50 \mu l$  /ウェル加えて 4℃で 30 分間反応させた。反応後、上記と同様の洗浄操作を 3 回行った後フローサイトメーター (コールター社製) にて前方散乱、90 度散乱にて多形核白血球と認められる細胞に関して解析を行った。また、同じ細胞をメイ・グリュントワルト・ギムザ染色法 (染色法のすべて：医歯薬出版株式会社 1988 年) にて染色し多形核白血球に関して観察したところ、75% が好酸球であることを確認した。

第 57 図に得られたヒストグラムを示す。抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖モノクローナル抗体 KM1259 は明らかな反応性を示した。解析した細胞の 75% は好酸球であることが確かめられていることから、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  鎖モノクローナル KM1259 はヒ

ト好酸球に対する反応性を有していることが確認された。

#### 4. 抗 IL-5R $\alpha$ 抗体を用いたヒト好酸球の生存抑制

正常人血液より多形核白血球画分を調製し、ヒト IL-5 の存在下での好酸球生存に対する抗 IL-5R  $\alpha$  抗体の作用を検討した。

15ml 容量のポリプロピレン製遠心管にポリモルフプレップ (polymorphprep、ニコメッド社製) を 4ml ずつ 15 本に分注しそれぞれにヘパリン処理をした正常人血 8ml を重層した。これを 500 $\times$ g、室温で 30 分間遠心分離して多形核白血球を分離、回収した。

9 容量のパーコール溶液 (Percoll、ファルマシア社製) に 1 容量の滅菌した 1.5M 食塩水を加えパーコールストック溶液を調製した。8 容量のパーコールストック溶液に 2 容量の生理食塩水を加え 80%パーコール溶液を調製し、6 容量のパーコールストック溶液に 4 容量の生理食塩水を加え 60%パーコール溶液を調製した。混在する単核球を除く目的で、15ml 容量のポリプロピレン製遠心管 2 本に 5ml の 60%パーコール溶液を分注し、ここに先に得られた RPMI1640 培地に懸濁した多形核白血球を重層し、500 $\times$ g、室温で 30 分間遠心分離して沈殿した多形核白血球を分離、回収した。さらに混在する赤血球を除く目的で、5ml の 80%パーコール溶液を 2 本の 15ml 容量のポリプロピレン製遠心管に分注し、ここに先に得られた RPMI1640 培地に懸濁した多形核白血球を重層し、500 $\times$ g、室温で 30 分間遠心分離してパーコール層に浮遊している多形核白血球を分離、回収した。

48 ウェルの細胞培養用プレートに  $2 \times 10^6$  個/ウェルの細胞を分注し、最終濃度 0.1ng/ml のヒト IL-5 を添加し、さらに最終濃度 1  $\mu$ g/ml の各種抗 IL-5R  $\alpha$  抗体をそれぞれ添加した。各抗体につき 2 ウェル培養し、各ウェルの液量は最終的に 1ml となるように調製した。CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 3 日間培養し、培養終了後各ウェルから全量の細胞懸濁液を回収し、遠心分離 (3,000rpm、1 分) して細胞を回収した。得られた細胞を 100  $\mu$ l の PBS に懸濁し、そのうちの 50  $\mu$ l を用いて細胞標本作製装置：サイトスピン 3 [Cytospin3、シャンドン (Shandon) 社製] にて標本作製した。メイ・グリュントワルト・ギムザ染色法

にて染色後、各標本に関して 200 個の細胞を観察し、好酸球の数を求めた。

結果を第 5 8 図に示すが、モノクローナル抗体 KM1259 および KM1486、ならびにヒト化抗体 KM1399、KM7399、KM8399 および KM9399 はいずれも IL-5 による好酸球寿命延長を抑制する活性が認められたが、モノクローナル抗体 KM1257 にはこのような活性が認められなかった。

#### 5. 抗 hIL-5R $\alpha$ 抗体を用いた shIL-5R $\alpha$ の検出

96 ウェルの EIA 用プレート（グライナー社製）に、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1257 を 10  $\mu$ g/ml の濃度に PBS で希釈し、50  $\mu$ l/ウェルずつ分注し、4  $^{\circ}$ C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS を 100  $\mu$ l/ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、1000~0.1ng/ml の濃度に 1%BSA-PBS で希釈した実施例 1 の 1(9) で得られた精製 shIL-5R  $\alpha$  を 4  $^{\circ}$ C で一晩反応させた。tween-PBS で洗浄後、公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊 1985 年）でビオチン標識した抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1259 を 1  $\mu$ g/ml の濃度に 1%BSA-PBS で希釈して 50  $\mu$ l/ウェルずつ加えて室温にて 2 時間反応させた。tween-PBS で洗浄後、4000 倍に 1%BSA-PBS で希釈したアビジン標識ペルオキシダーゼ（ニチレイ社製）50  $\mu$ l/ウェルを加えて室温にて 1 時間反応させた。tween-PBS で洗浄後 ABTS 基質液 [2,2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸）アンモニウム] を用いて発色させ OD<sub>415nm</sub> の吸光度を測定した（NJ2001；日本インターメッド社製）。

結果を第 5 9 図に示す。この結果、抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1257 およびビオチン標識抗ヒト IL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 KM1259 を用いることにより shIL-5R  $\alpha$  を測定することができることが明らかとなった。

#### 6. ウェスタンブロッティング法による shIL-5R $\alpha$ の検出

実施例 1 の 1 (9) で述べた shIL-5R  $\alpha$  を 2-メルカプトエタノールを含む SDS-PAGE 用サンプルバッファーあるいは 2-メルカプトエタノールを含まない SDS-PAGE 用サンプルバッファー中にて加熱変性させた。該溶液を市販の SDS-PAGE 用グラジエントゲル（アトー社製）にて電気泳動した後、PVDF 膜（ミリポア社製）

に蛋白質を転写した。該PVDF膜を10%BSAを含むPBSに浸して4℃にて一晩放置してブロッキングを行い、ブロッキング終了後0.05%Tweenを含むPBSにてよく洗浄した。該PVDF膜を実施例1の5で得られたハイブリドーマの培養上清に室温で2時間浸し、0.05%Tweenを含むPBSにてよく洗浄した。さらにペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体（和光純薬社製）を1%BSA-PBSで1000倍希釈した溶液に該PVDF膜を室温で1時間浸し、0.05%Tweenを含むPBSにてよく洗浄した。洗浄液をよく除いた後、ECL試薬（アマシャム社製）を該PVDF膜にかけ1分間反応させた。過剰量の試薬を除きプラスチックフィルムに該PVDF膜を挟んでX線フィルム感光用カセットに入れてECL用フィルムを感光させ、抗体の反応性を確認した。

結果を第60図に示す。KM1257は反応性を示したが、KM1259、KM1486は反応性を示さなかった。

#### 7. shIL-5R $\alpha$ の免疫沈降

96ウェルのEIA用プラスチックプレートに抗マウスイムノグロブリン抗体（DAKO社製）をPBSで50倍希釈したものを200 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、4℃にて一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSAを含むPBSを300 $\mu$ l/ウェルずつ分注して室温で1時間放置し、ブロッキングを行った。PBSにて洗浄後、実施例で得られた抗ヒトIL-5R $\alpha$ モノクローナル抗体であるKM1257、KM1259あるいはKM1486の培養上清を200 $\mu$ lずつ加え、4℃にて一晩放置して抗体を吸着させた。プレートを洗浄後、実施例1の1で得られたshIL-5R $\alpha$ を10 $\mu$ g/mlの濃度に1%BSAで希釈したものを50 $\mu$ lずつ分注し、4℃で一晩反応させた。プレートを0.05%Tweenを含むPBSにて洗浄後、5倍濃度の2-メルカプトエタノールを含まないSDS-PAGE用サンプルバッファー[0.31Mトリス(pH6.8)、10%SDS、50%グリセロール]あるいは2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE用サンプルバッファー[0.31Mトリス(pH6.8)、10%SDS、50%グリセロール、25% 2-メルカプトエタノール]を50 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、振とうしながら室温で2時間放置した。200 $\mu$ lのPBSに該反応液を加え、ヒートブロックにて加熱した後、市販のSDS-PAGE用グラジエントゲル（アトー社製）にて25 $\mu$ lの該溶液を分離した。電気泳動終了後、PV

DF膜（ミリポア社製）に転写を行った。該PVDF膜を実施例3の6に示した方法でKM1257を用いてウェスタンブロッティングを行い、shIL-5R $\alpha$ を検出した。

結果を第61図に示す。KM1257、KM1259、KM1486ともにshIL-5R $\alpha$ を免疫沈降することが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、ヒト好酸球上に特異的に発現されていると考えられるヒトIL-5受容体 $\alpha$ 鎖に特異的に結合するモノクローナル抗体KM1257、KM1259およびKM1486が提供される。また、ヒト好酸球上に特異的に発現されていると考えられるヒトIL-5受容体 $\alpha$ 鎖に特異的に結合し、かつヒトIL-5の生物活性を阻害できるヒト化抗体KM1399、KM8399、KM7399およびKM9399が提供される。本発明の抗体は免疫細胞染色におけるヒト好酸球の免疫学的検出、IL-5の生物活性の阻害によるアレルギー性疾患の診断、治療等に有用である。特にヒト化抗体においてはモノクローナル抗体よりも免疫原性が低く、その効果が長期にわたり持続することが期待される。

配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAAAGCTTAC CATGATCATC GTGGCGCATG TA 32

配列番号：2

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAGGATCCCT ACTTACCCAC ATAAATAGGT TG 32

配列番号：3

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAGATATCTC ACTTCTCCCA CCTGTCA 27

配列番号：4

配列の長さ：88

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
AGCTTCCACC ATGGAGTTTG GGCTCAGCTG GCTTTTTCTT GTCCTTGTTT TCAAAGGTGT 60
TCAGTGTGAC TTACTTCCTG ATGAAAAG 88
```

配列番号：5

配列の長さ：84

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
CTTTTCATCA GGAAGTAAGT CACACTGAAC ACCTTTGAAA ACAAGGACAA GAAAAAGCCA 60
GCTGAGCCCA AACTCCATGG TGGA 84
```

配列番号：6

配列の長さ：51

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
AGCTTCCACC ATGGCTACAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG G 51
```



配列番号：7

配列の長さ：58

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCTGCTCTGC CTGCCCTGGC TTCAAGAGGG CAGTGCCGAC TTACTTCCTG ATGAAAAG 58

配列番号：8

配列の長さ：64

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CTTTTCATCA GGAAGTAAGT CGGCACTGCC CTCTTGAAGC CAGGGCAGGC AGAGCAGGCC 60

AAAA 64

配列番号：9

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GCCAGGAGCA GGGACGTCCG GGAGCCTGTA GCCATGGTGG A 41

配列番号：10

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GGCAGCGGCG GTTCCGGTGA GCCCAAATCT TGTGACAAA

39

配列番号：11

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAGGATCCCC CGTCGCACTC ATTTACCCGG AGAC

34

配列番号：12

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAAAGCTTCC ACCATGGAGT TTGGGCTCAG CTGG

34

配列番号：13

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ACCGGAACCG CCGCTGCCCT TACCCACATA AATAGGTTG

39

配列番号：14

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAAAGCTTCC ACCATGGCTA CAGGCTCCCG GACG

34

配列番号：15

配列の長さ：76

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CGATAAGCTA TGAAAACTAC AGCCTTGGAG GAAGCTTAAA TGAGCTCGAT ATCAAGGCCT 60

ACCCGGGCGC CATGCA

76

配列番号：16

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CACTCAGTGT TAACTGAGGA GCAGGTGAAT TC

32

配列番号：17

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGCTGAATTC ACCTGCTCCT CAGTTAACAC TGAGTGGTAC

40

配列番号：18

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AATTCGTACG GTGGCTGCAC C

21

配列番号：19

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GGTGCAGCCA CCGTACG

17

配列番号：20

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CTCGCGACTA GTGGGCCCCG GGGCCG

26

配列番号：21

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGCTGCGGCC GCGGGCCCAC TAGTCGCGAG GTAC

34

配列番号：22

配列の長さ：421

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..57

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：148..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：205..255

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：352..387

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG AAC TTC GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GCC CTC ATT TTA AAA GGT 48

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

-15

-10

-5

```

GTC CAA TGT GAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTA GTG AAG      96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
      -1   1               5               10
CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC      144
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      15               20               25
AGT GAC TAT GGC ATG GCT TGG ATT CGC CAA ATT TCA GAC AAG AGG CCG      192
Ser Asp Tyr Gly Met Ala Trp Ile Arg Gln Ile Ser Asp Lys Arg Pro
      30               35               40               45
GAG TGG GTC GCA GCC ATT AGC AGT GGT GGT AGT TAC ATC CAC TTT CCA      240
Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile His Phe Pro
              50               55               60
GAC AGT TTG AAG GGG CGA TTC ACC GTC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC      288
Asp Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
              65               70               75
ACC CTG TAC CTG GAA ATG AGC GGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCT ATG      336
Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Gly Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
              80               85               90
TAT TAC TGT GCA AGA CGG GGC TTC TAT GGT AAC TAC CGG GCT ATG GAC      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Phe Tyr Gly Asn Tyr Arg Ala Met Asp
              95               100               105
TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA G      421
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
      110               115               120 121

```

配列番号 : 23

配列の長さ : 394

配列の型 : 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..60

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：130..174

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：220..240

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：337..363

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG GAG AAA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTC CTG CTT CTC TGG GTT CCA	48
Met Glu Lys Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
-20                      -15                      -10                      -5	
GGT TCC AGA AGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT	96
Gly Ser Arg Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala	
-1    1                      5                      10	



```

GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AGA GCC AAC GAA AGT      144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser
      15              20              25

GTT GAT CAT AAT GGC GTC AAT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA      192
Val Asp His Asn Gly Val Asn Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
      30              35              40

GGA CAG TCA CCC AAG CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAC CAA GGA TCC      240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
      45              50              55              60

GGC GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC AGT      288
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
      65              70              75

CTC AAC ATC CAT CCT ATG GAG GAG GAT GAT GCT GCA ATG TAT TTC TGT      336
Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys
      80              85              90

CAG CAA AGT AAG GAT GTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AGG TTG      384
Gln Gln Ser Lys Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
      95              100             105

GAA ATC AAA C                                                                394
Glu Ile Lys
      110 111

```

配列番号 : 24

配列の長さ : 421

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

## 配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..57

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：148..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：205..255

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：352..387

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

## 配列：

ATG GAA TGG AGT TGG ATA TTT CTC TTT CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-15                                  -10                                  -5	
GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAA CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTA AAG	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
-1    1                                  5                                  10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15                                  20                                  25	

```

ACT AGT TAT GTT ATT CAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGT CAG GGC CTT      192
Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30              35              40              45
GCG TGG ATT GGA TAT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGG ACT AAG TAC AAT      240
Ala Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
              50              55              60
GAG AGG TTC AAA GGC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AGA TCC TCC AGC      288
Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser
              65              70              75
ACA GTC TAC ATG GAG CTC AGT AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC      336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
              80              85              90
TAT CTC TGT GGG AGA GAA GGA ATT AGG TAC TAT GGT CTA CTG GGA GAC      384
Tyr Leu Cys Gly Arg Glu Gly Ile Arg Tyr Tyr Gly Leu Leu Gly Asp
              95              100              105
TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA G                      421
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110              115              120 121

```

配列番号 : 25

配列の長さ : 382

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 1.. 60



GAA	CTC	CTG	ATC	TAC	CAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAG	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	240
Glu	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
45					50					55					60	
AGG	TTC	AGT	GGC	AGC	GGG	TCT	GGA	ACA	GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATT	AGT	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	
				65					70					75		
GAC	CTG	GAG	CAA	GAA	GAT	ATT	GCC	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	TAT	336
Asp	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Tyr	
			80						85					90		
ACG	CTT	CCG	TAC	ACG	GTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	TTG	GAA	ATA	AAA	C	382
Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
		95					100					105		107		

配列番号：26

配列の長さ : 412

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴：

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置：1..57

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：148..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号: domain

存在位置：205..255

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：352..378

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG AAA TGC AGC TGG GTT ATC TTC TTC CTG ATG GCA GTG GTT ACA GGG	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
GTC AAT TCA GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys	
-1 1 5 10	
CCA GGG GCC TCA GTC AAC TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT	144
Pro Gly Ala Ser Val Asn Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG	192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AAT GGT AAT ACT AAA TCT GAC	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Ser Asp	
50 55 60	
CCG AAG TTC CAG GCC AAG GCC ACT ATA GCA GCA GAC ACA TCC TCC AAC	288
Pro Lys Phe Gln Ala Lys Ala Thr Ile Ala Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	

ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC 336  
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 80 85 90  
 TAT TAC TGT ACT GGT GGA CTA CGG CTA CGG TTC TTT GAC TAT TGG GGC 384  
 Tyr Tyr Cys Thr Gly Gly Leu Arg Leu Arg Phe Phe Asp Tyr Trp Gly  
 95 100 105  
 CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA G 412  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 110 115 118

配列番号 : 27

配列の長さ : 331

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 79..108

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : CDR1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 154..174

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : CDR2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 271..300

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : CDR3

配列:

TCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA	48
Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala	
-1 1 5 10	
TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGT TCA AGT GTA	96
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val	
15 20 25	
AGT TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA	144
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg	
30 35 40 45	
TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC	192
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe	
50 55 60	
AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG	240
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met	
65 70 75	
GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC	288
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn	
80 85 90	
CCA CCC ATC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA C	331
Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
95 100 105 107	

配列番号 : 28

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド



配列:

Asp Tyr Gly Met Ala

配列番号 : 29

配列の長さ : 17

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile His Phe Pro Asp Ser Leu Lys Gly

配列番号 : 30

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Arg Gly Phe Tyr Gly Asn Tyr Arg Ala Met Asp Tyr

配列番号 : 31

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp His Asn Gly Val Asn Phe Met Asn

配列番号 : 32

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser

配列番号 : 33

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Gln Gln Ser Lys Asp Val Pro Trp Thr

配列番号 : 34

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Ser Tyr Val Ile His

配列番号 : 35

配列の長さ : 17

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly

配列番号 : 36

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Glu Gly Ile Arg Tyr Tyr Gly Leu Leu Gly Asp Tyr

配列番号 : 37

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Gly Thr Ser Glu Asp Ile Ile Asn Tyr Leu Asn

配列番号 : 38

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

His Thr Ser Arg Leu Gln Ser

配列番号 : 39

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr Thr

配列番号 : 40

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列:

Asp Thr Tyr Met His

配列番号: 41

配列の長さ: 17

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe Gln Ala

配列番号: 42

配列の長さ: 9

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Gly Leu Arg Leu Arg Phe Phe Asp Tyr

配列番号: 43

配列の長さ: 10

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

配列番号: 44

配列の長さ: 7

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

配列番号: 45

配列の長さ: 10

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Ile Thr

配列番号: 46

配列の長さ: 39

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

GCACCACTCT CACAGTCTCC TCAGCCAGTA CTAAGGGCC

39

配列番号: 47

配列の長さ: 31

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

CTTAGTACTG GCTGAGGAGA CTGTGAGAGT G

31

配列番号: 48

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

GACCAAGTTG GAAATAAAAC

20

配列番号: 49

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列:

GTACGTTTTA TTTCCAACCTT G

21

配列番号 : 50

配列の長さ : 97

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

CAGGAAACAG CTATGACGCG GCCGCCACCA TGAATGGAG TTGGATATTT CTCTTTCTCC 60

TGTCAGGAAC TGCAGGTGTC CACTCTGAGG TCCAGCT 97

配列番号 : 51

配列の長さ : 96

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

GAATGTGTAT CCAGAAGCCT TGCAGGAAAC CTTCACTGAA GCCCCAGGCT TCTTCACCTC 60

AGCTCCAGAC TGCACCAGCT GGACCTCAGA GTGGAC 96

配列番号 : 52

配列の長さ : 96

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状



配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGGCTTCTGG ATACACATTC ACTAGTTATG TTATTCAGT GGTGCGACAG GCCCCTGGTC 60

AGGGCCTTGA GTGGATGGGA TATATTAATC CTTACA 96

配列番号：53

配列の長さ：98

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TGTAGGCTGT GCTCGTGGAC GTGTCTGCAG TGATTGTGAC TCTGCCTTTG AACCTCTCAT 60

TGTAAGTAGT CCCATCATTG TAAGGATTAA TATATCCC 96

配列番号：54

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTCCACGAGC ACAGCCTACA TGGAGCTCAG TTCGCTGAGA TCTGAGGACA CGGCGGTGTA 60

TTACTGTGCG AGAGAAGGAA TTAGGTACTA TGGTCT 96

配列番号：55

配列の長さ：100

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
GTTTTCCAG TCACGACGGG CCCTTGGTGG AGGCTGAGGA GACTGTGACC AGGGTGCCTT    60
GGCCCCAGTA GTCTCCCAGT AGACCATAGT ACCTAATTCC                               100
```

配列番号：56

配列の長さ：421

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..57

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：148..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：205..255

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：352..378

特徴を決定した方法：S

他の情報 : CDR3

配列:

ATG GAA TGG AGT TGG ATA TTT CTC TTT CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-15 -10 -5	
GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT AGT TAT GTT ATT CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGT CAG GGC CTT	192
Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TAT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGG ACT AAG TAC AAT	240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn	
50 55 60	
GAG AGG TTC AAA GGC AGA GTC ACA ATC ACT GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Glu Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGT TCG CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCG GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GAA GGA ATT AGG TAC TAT GGT CTA CTG GGA GAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Arg Tyr Tyr Gly Leu Leu Gly Asp	
95 100 105	

TAC TGG GGC CAA GGC ACC CTG GTC ACA GTC TCC TCA G 421  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 120 121

配列番号 : 57

配列の長さ : 87

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

CAGGAAACAG CTATGACGAA TTCCACCATG ATGTCCTCTG CTCAGTTCCT TGGTCTCCTG 60  
TTGCTCTGTT TTCAAGACAT CAGATGT 87

配列番号 : 58

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

GATGGTGACT CTGTCTCCTA CAGAGGCAGA CAGGGAGGAT GGAGACTGTG TCATCTGGAT 60  
ATCACATCTG ATGTCTTGAA AAC 83

配列番号 : 59

配列の長さ : 92

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TAGGAGACAG AGTCACCATC ACTTGCGGGA CAAGTGAGGA CATTATCAAT TATTTAAACT 60  
GGTATCAACA GAAACCAGGG AAAGCCCCTA AG 92

配列番号：60

配列の長さ：90

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TTCCAGACCC GCTGCCACTG AACCTTGATG GGA CTCTCTGA CTGTAATCTT GATGTGTGGT 60  
AGATCAGGAG CTTAGGGGCT TTCCCTGGTT 90

配列番号：61

配列の長さ：88

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAGTGGCAGC GGGTCTGGAA CAGATTTTAC TCTCACCATT AGTAGTCTGC AACCTGAAGA 60  
TTTTGCCACT TACTACTGCC AACAGGGT 88

配列番号：62

配列の長さ：91

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
GTTTTCCCAG TCACGACCGT ACGTTTATT TCCACCTTGG TCCCTTGGCC GAACGTGTAC 60
GGAAGCGTAT AACCTGTTG GCAGTAGTAA G 91
```

配列番号：63

配列の長さ：382

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..60

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：130..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：208..228

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：325..351

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA	48
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
-20                      -15                      -10                      -5	
GAT ATC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT	96
Asp Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
-1      1                      5                      10	
GCC TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC GGG ACA AGT GAG GAC	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Thr Ser Glu Asp	
15                      20                      25	
ATT ATC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT	192
Ile Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30                      35                      40	
AAG CTC CTG ATC TAC CAC ACA TCA AGA TTA CAG TCA GGA GTC CCA TCA	240
Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser	
45                      50                      55                      60	
AGG TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGA ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT AGT	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
65                      70                      75	
AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCC ACT TAC TAC TGC CAA CAG GGT TAT	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr	
80                      85                      90	
ACG CTT CCG TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATA AAA C	382
Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95                      100                      105                      107	

配列番号：64

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
GTCCACGAGC ACAGCCTACA TGGAGCTCAG TTCGCTGAGA TCTGAGGACA CGGCGGTGTA    60
TCTCTGTGGG AGAGAAGGAA TTAGGTACTA TGGTCT                                96
```

配列番号：65

配列の長さ：421

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..57

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：148..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：205..255

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2



特徴を表す記号：domain

存在位置：352..378

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG GAA TGG AGT TGG ATA TTT CTC TTT CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-15                      -10                      -5	
GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1    1                      5                      10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15                      20                      25	
ACT AGT TAT GTT ATT CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGT CAG GGC CTT	192
Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30                      35                      40                      45	
GAG TGG ATG GGA TAT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGG ACT AAG TAC AAT	240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn	
50                      55                      60	
GAG AGG TTC AAA GGC AGA GTC ACA ATC ACT GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Glu Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65                      70                      75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGT TCG CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCG GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80                      85                      90	

TAT CTC TGT GGG AGA GAA GGA ATT AGG TAC TAT GGT CTA CTG GGA GAC 384  
 Tyr Leu Cys Gly Arg Glu Gly Ile Arg Tyr Tyr Gly Leu Leu Gly Asp  
           95                          100                          105  
 TAC TGG GGC CAA GGC ACC CTG GTC ACA GTC TCC TCA G 421  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110                          115                          120 121

配列番号 : 66

配列の長さ : 96

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

AGGCTTCTGG ATACACATTC ACTAGTTATG TTATTCAC TG GGTGCGACAG GCCCCTGGTC 60  
 AGGGCCTTGC GTGGATGGGA TATATTAATC CTTACA 96

配列番号 : 67

配列の長さ : 98

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

TGTAGGCTGT GCTCGTGGAC CTGTCTGCAG TGATTGTGAC TCTGCCTTTG AACCTCTCAT 60  
 TGTACTTAGT CCCATCATTG TAAGGATTAA TATATCCC 96

配列番号 : 68

配列の長さ : 421

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 1..57

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 148..162

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : CDR1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 205..255

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : CDR2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 352..378

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : CDR3

配列 :

ATG GAA TGG AGT TGG ATA TTT CTC TTT CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

-15

-10

-5

GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT AGT TAT GTT ATT CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGT CAG GGC CTT	192
Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GCG TGG ATG GGA TAT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGG ACT AAG TAC AAT	240
Ala Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn	
50 55 60	
GAG AGG TTC AAA GGC AGA GTC ACA ATC ACT GCA GAC AGG TCC ACG AGC	288
Glu Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGT TCG CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCG GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT CTC TGT GGG AGA GAA GGA ATT AGG TAC TAT GGT CTA CTG GGA GAC	384
Tyr Leu Cys Gly Arg Glu Gly Ile Arg Tyr Tyr Gly Leu Leu Gly Asp	
95 100 105	
TAC TGG GGC CAA GGC ACC CTG GTC ACA GTC TCC TCA G	421
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120 121	

配列番号 : 69

配列の長さ : 96

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGGCTTCTGG ATACACATTC ACTAGTTATG TTATTCAGTG GGTGCGACAG AGGCCTGGTC 60

AGGCCTTGC GTGGATGGGA TATATTAATC CTTACA 96

配列番号：70

配列の長さ：98

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TGTAGACTGT GCTCGTGGAC CTGTCTGAAG TGATTGTGAC TTTGCCTTTG AACCTCTCAT 60

TGTACTTAGT CCCATCATTG TAAGGATTAA TATATCCC 98

配列番号：71

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTCCACGAGC ACAGTCTACA TGGAGCTCAG TTCGCTGAGA TCTGAGGACA CGGCGGTGTA 60

TCTCTGTGGG AGAGAAGGAA TTAGGTACTA TGGTCT 96

配列番号：72

配列の長さ：421

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..57

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：148..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：205..255

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：352..378

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG GAA TGG AGT TGG ATA TTT CTC TTT CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

-15

-10

-5

GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1   1                          5                          10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15                          20                          25	
ACT AGT TAT GTT ATT CAC TGG GTG CGA CAG AGG CCT GGT CAG GGC CTT	192
Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30                          35                          40                          45	
GCG TGG ATG GGA TAT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGG ACT AAG TAC AAT	240
Ala Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn	
50                          55                          60	
GAG AGG TTC AAA GGC AAA GTC ACA ATC ACT TCA GAC AGG TCC ACG AGC	288
Glu Arg Phe Lys Gly Lys Val Thr Ile Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser	
65                          70                          75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTC AGT TCG CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCG GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80                          85                          90	
TAT CTC TGT GGG AGA GAA GGA ATT AGG TAC TAT GGT CTA CTG GGA GAC	384
Tyr Leu Cys Gly Arg Glu Gly Ile Arg Tyr Tyr Gly Leu Leu Gly Asp	
95                          100                          105	
TAC TGG GGC CAA GGC ACC CTG GTC ACA GTC TCC TCA G	421
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
110                          115                          120 121	

配列番号 : 73

配列の長さ : 92

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TAGGAGACAG AGTCACCATC ACTTGCGGGA CAAGTGAGGA CATTATCAAT TATTTAAACT	60
GGTATCGGCA GAAACCAGGG AAAGCCCCTG AA	92

配列番号：74

配列の長さ：90

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TTCCAGACCC GCTGCCACTG AACCTTGATG GGA CTCTGA CTGTAATCTT GATGTGTGGT	60
AGATCAGGAG TTCAGGGGCT TTCCCTGGTT	90

配列番号：75

配列の長さ：91

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTTTTCCCAG TCACGACCGT ACGTTTTATT TCCACCTTGG TCCCTTGGCC GACCGTGTAC	60
GGAAGCGTAT AACCTGTTG GCAGTAGTAA G	91



配列番号：76

配列の長さ：382

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..60

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：130..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：208..228

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：325..351

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20

-15

-10

-5

GAT ATC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT	96
Asp Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
-1 1 5 10	
GCC TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC GGG ACA AGT GAG GAC	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Thr Ser Glu Asp	
15 20 25	
ATT ATC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CGG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT	192
Ile Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
GAA CTC CTG ATC TAC CAC ACA TCA AGA TTA CAG TCA GGA GTC CCA TCA	240
Glu Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
AGG TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGA ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT AGT	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCC ACT TAC TAC TGC CAA CAG GGT TAT	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr	
80 85 90	
ACG CTT CCG TAC ACG GTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATA AAA C	382
Thr Leu Pro Tyr Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105 107	

配列番号 : 77

配列の長さ : 92

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

## 配列:

TAGGAGACAG AGTCACCATC GGTTGCGGGA CAAGTGAGGA CATTATCAAT TATTTAAACT 60  
GGTATCGGCA GAAACCAGGG AAAGCCCCTG AA 92

配列番号: 78

配列の長さ: 88

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

## 配列:

CAGTGGCAGC GGGTCTGGAA CAGATTTAC TCTCACCATT AGTGACCTGC AACCTGAAGA 60  
TTTTGCCACT TACTACTGCC AACAGGGT 88

配列番号: 79

配列の長さ: 382

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

## 配列の特徴:

特徴を表す記号: sig peptide

存在位置: 1..60

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: domain

存在位置: 130..162

特徴を決定した方法: S

他の情報: CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：208..228

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号: domain

存在位置：325..351

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列:

ATG	ATG	TCC	TCT	GCT	CAG	TTC	CTT	GGT	CTC	CTG	TTG	CTC	TGT	TTT	CAA	48
Met	Met	Ser	Ser	Ala	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Gln	
-20					-15					-10					-5	
GAT	ATC	AGA	TGT	GAT	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	96
Asp	Ile	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
			-1	1				5					10			
GCC	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	GGT	TGC	GGG	ACA	AGT	GAG	GAC	144
Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Gly	Cys	Gly	Thr	Ser	Glu	Asp	
		15					20					25				
ATT	ATC	AAT	TAT	TTA	AAC	TGG	TAT	CGG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	CCT	192
Ile	Ile	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	
	30					35				40						
GAA	CTC	CTG	ATC	TAC	CAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAG	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	240
Glu	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
45					50					55					60	
AGG	TTC	AGT	GGC	AGC	GGG	TCT	GGA	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATT	AGT	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
				65				70						75		

```

GAC CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCC ACT TAC TAC TGC CAA CAG GGT TAT      336
Asp Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr
      80                      85                      90
ACG CTT CCG TAC ACG GTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATA AAA C      382
Thr Leu Pro Tyr Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      95                      100                      105      107

```

配列番号：80

配列の長さ：83

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```

GATGGTGACT CTGTCTCCTA CAGAGGCAGA CAGGGAGGAT GTAGCCTGTG TCATCTGGAT      60
ATCACATCTG ATGTCTTGAA AAC                                          23

```

配列番号：81

配列の長さ：92

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```

TAGGAGACAG AGTCACCATC GGTGCGGGA CAAGTGAGGA CATTATCAAT TATTTAACT      60
GGTATCGGAA GAAACCAGGG AAAGCCCCTG AA                                          92

```

配列番号：82

配列の長さ：88

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
CAGTGGCAGC GGGTCTGGAA CAGATTTTAC TCTACCATT AGTGACCTGC AACCTGAAGA 60
TTTTGCCACT TACTTTTGCC AACAGGGT 88
```

配列番号：83

配列の長さ：91

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

```
GTTTTCCCAG TCACGACCGT ACGTTTTATT TCCACCTTGG TCCCTTGGCC GACCGTGTAC 60
GGAAGCGTAT AACCTGTTG GCAAAAGTAA G 91
```

配列番号：84

配列の長さ：382

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..60

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：130..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：208..228

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：325..351

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA	48
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
-20                      -15                      -10                      -5	
GAT ATC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG GCT ACA TCC TCC CTG TCT	96
Asp Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Thr Ser Ser Leu Ser	
-1    1                      5                      10	
GCC TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC GGT TGC GGG ACA AGT GAG GAC	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Gly Cys Gly Thr Ser Glu Asp	
15                      20                      25	
ATT ATC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CGG AAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT	192
Ile Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Lys Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30                      35                      40	

GAA	CTC	CTG	ATC	TAC	CAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAG	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	240
Glu	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
45					50					55					60	
AGG	TTC	AGT	GGC	AGC	GGG	TCT	GGA	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATT	AGT	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
				65					70					75		
GAC	CTG	CAA	CCT	GAA	GAT	TTT	GCC	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	TAT	336
Asp	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Tyr	
			80					85					90			
ACG	CTT	CCG	TAC	ACG	GTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATA	AAA	C	382
Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Val	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
		95					100					105				

配列番号：85

配列の長さ : 92

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列:

TAGGAGACAG AGTCACCATC GGTTCGCGGA CAAGTGAGGA CATTATCAAT TATTTAAACT 60  
GGTATCGGAA GAAACCAGGG AAAGCCGTTG AA 92

配列番号：86

配列の長さ : 90

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状



配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TTCCAGACCC GCTGCCACTG AACCTTGATG GGACTCCTGA CTGTAATCTT GATGTGTGGT 60  
AGATCAGGAG TTCAACGGCT TTCCCTGGTT 90

配列番号：87

配列の長さ：88

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAGTGGCAGC GGGTCTGGAA CAGATTATAC TCTCACCATT AGTGACCTGC AACCTGAAGA 60  
TTTTGCCACT TACTTTTGCC AACAGGGT 88

配列番号：88

配列の長さ：382

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：1..60

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：130..162

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR1

特徴を表す記号：domain

存在位置：208..228

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR2

特徴を表す記号：domain

存在位置：325..351

特徴を決定した方法：S

他の情報：CDR3

配列：

ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA	48
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
-20                                 -15                                 -10                                 -5	
GAT ATC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG GCT ACA TCC TCC CTG TCT	96
Asp Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Thr Ser Ser Leu Ser	
-1     1                                 5                                 10	
GCC TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC GGT TGC GGG ACA AGT GAG GAC	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Gly Cys Gly Thr Ser Glu Asp	
15                                 20                                 25	
ATT ATC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CGG AAG AAA CCA GGG AAA GCC GTT	192
Ile Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Lys Lys Pro Gly Lys Ala Val	
30                                 35                                 40	
GAA CTC CTG ATC TAC CAC ACA TCA AGA TTA CAG TCA GGA GTC CCA TCA	240
Glu Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser	
45                                 50                                 55                                 60	
AGG TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGA ACA GAT TAT ACT CTC ACC ATT AGT	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65                                 70                                 75	

GAC CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT TAT	336
Asp Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr	
80 85 90	
ACG CTT CCG TAC ACG GTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATA AAA C	382
Thr Leu Pro Tyr Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105 107	

配列番号 : 89

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

GCTTCCACCA AGGGCCCATC CGTCT 25

配列番号 : 90

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列:

AAGGATCCTG GCACTCATTT ACCCAGAGAC 30

配列番号 : 91

配列の長さ : 313

配列の型 : アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Asp	Leu	Leu	Pro	Asp	Glu	Lys	Ile	Ser	Leu	Leu	Pro	Pro	Val	Asn	1	5	10	15
Phe	Thr	Ile	Lys	Val	Thr	Gly	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Leu	Gln	Trp	20	25	30	
Lys	Pro	Asn	Pro	Asp	Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	Val	Asn	Leu	Glu	Tyr	35	40	45	
Gln	Val	Lys	Ile	Asn	Ala	Pro	Lys	Glu	Asp	Asp	Tyr	Glu	Thr	Arg	50	55	60	
Ile	Thr	Glu	Ser	Lys	Cys	Val	Thr	Ile	Leu	His	Lys	Gly	Phe	Ser	65	70	75	
Ala	Ser	Val	Arg	Thr	Ile	Leu	Gln	Asn	Asp	His	Ser	Leu	Leu	Ala	80	85	90	
Ser	Ser	Trp	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	His	Ala	Pro	Pro	Gly	Ser	Pro	95	100	105	
Gly	Thr	Ser	Val	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Thr	Glu	110	115	120	
Asp	Asn	Tyr	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Tyr	Gln	Val	Ser	Leu	His	Cys	125	130	135	
Thr	Trp	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Pro	Glu	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	140	145	150	
Leu	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	Gly	Ser	Trp	Thr	Glu	Glu	Cys	Gln	Glu	Tyr	155	160	165	
Ser	Lys	Asp	Thr	Leu	Gly	Arg	Asn	Ile	Ala	Cys	Trp	Phe	Pro	Arg	170	175	180	
Thr	Phe	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Arg	Asp	Trp	Leu	Ala	Val	Leu	Val	185	190	195	
Asn	Gly	Ser	Ser	Lys	His	Ser	Ala	Ile	Arg	Pro	Phe	Asp	Gln	Leu	200	205	210	
Phe	Ala	Leu	His	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Pro	Pro	Leu	Asn	Val	215	220	225	
Thr	Ala	Glu	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Leu	Ser	Ile	Gln	Trp	Glu	Lys	230	235	240	

Pro	Val	Ser	Ala	Phe	Pro	Ile	His	Cys	Phe	Asp	Tyr	Glu	Val	Lys
				245					250					255
Ile	His	Asn	Thr	Arg	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gln	Ile	Glu	Lys	Leu	Met
				260					265					270
Thr	Asn	Ala	Phe	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Asp	Leu	Ser	Lys	Tyr	Asp
				275					280					285
Val	Gln	Val	Arg	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Met	Cys	Arg	Glu	Ala	Gly
				290					295					300
Leu	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Gln	Pro	Ile	Tyr	Val	Gly	Lys		
				305					310			313		

## 請 求 の 範 囲

- (1) ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖に特異的に反応する抗体。
- (2) 抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体から選ばれる請求項1記載の抗体。
- (3) 抗体がモノクローナル抗体である請求項2記載の抗体。
- (4) ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖のN末端アミノ酸から1～313番目に存在するエピトープを認識し、かつ免疫細胞染色によりヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖に特異的に反応する請求項3記載のモノクローナル抗体。
- (5) ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖のN末端アミノ酸から1～313番目に存在するエピトープを認識し、かつヒトインターロイキン5の生物活性を抑制する請求項3記載のモノクローナル抗体。
- (6) IgG1サブクラスに属し、その抗体重鎖(H鎖)可変領域(V領域)のCDRの配列が下記に定義されるアミノ酸配列:  
CDR1 : Asp Tyr Gly Met Ala  
CDR2 : Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile His Phe Pro Asp Ser Leu Lys Gly  
CDR3 : Arg Gly Phe Tyr Gly Asn Tyr Arg Ala Met Asp Tyr  
であり、抗体軽鎖(L鎖)V領域のCDRの配列が下記に定義されるアミノ酸配列:  
CDR1 : Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp His Asn Gly Val Asn Phe Met Asn  
CDR2 : Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
CDR3 : Gln Gln Ser Lys Asp Val Pro Trp Thr  
である、請求項4記載のモノクローナル抗体。
- (7) ハイブリドーマKM1257(FERM BP-5133)が生産する請求項6記載のモノクローナル抗体KM1257。
- (8) IgG1サブクラスに属し、その抗体H鎖V領域のCDRの配列が下記に定義されるアミノ酸配列:  
CDR1 : Ser Tyr Val Ile His  
CDR2 : Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly

CDR3 : Glu Gly Ile Arg Tyr Tyr Gly Leu Leu Gly Asp Tyr

であり、抗体L鎖V領域のCDRの配列が下記に定義されるアミノ酸配列：

CDR1 : Gly Thr Ser Glu Asp Ile Ile Asn Tyr Leu Asn

CDR2 : His Thr Ser Arg Leu Gln Ser

CDR3 : Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr Thr

である、請求項5記載のモノクローナル抗体。

(9) ハイブリドーマKM1259 (FERM BP-5134) が生産する請求項8記載のモノクローナル抗体KM1259。

(10) IgG1サブクラスに属し、その抗体H鎖V領域のCDRの配列が下記に定義されるアミノ酸配列：

CDR1 : Asp Thr Tyr Met His

CDR2 : Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe Gln Ala

CDR3 : Gly Leu Arg Leu Arg Phe Phe Asp Tyr

であり、抗体L鎖V領域のCDRの配列が下記に定義されるアミノ酸配列：

CDR1 : Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

CDR2 : Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

CDR3 : Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Ile Thr

である、請求項5記載のモノクローナル抗体。

(11) ハイブリドーマKM1486 (FERM BP-5651) が生産する請求項10記載のモノクローナル抗体KM1486。

(12) 請求項6記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマKM1257 (FERM BP-5133)。

(13) 請求項8記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマKM1259 (FERM BP-5134)。

(14) 請求項10記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマKM1486 (FERM BP-5651)。

(15) 抗体がヒト化抗体である請求項2記載の抗体。

(16) ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖のN末端アミノ酸から1～313

番目に存在するエピトープを認識し、かつ免疫細胞染色によりヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖に特異的に反応する請求項 15 記載のヒト化抗体。

(17) ヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖の N 末端アミノ酸から 1～313 番目に存在するエピトープを認識し、かつヒトインターロイキン 5 の生物活性を抑制する請求項 15 記載のヒト化抗体。

(18) ヒト抗体 IgG 型に属する請求項 16 または 17 記載の抗体。

(19) ヒト化抗体がヒト型キメラ抗体である請求項 15、16 または 17 記載の抗体。

(20) ヒト型キメラ抗体がヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域とヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) と L 鎖 C 領域とからなるキメラ抗体である請求項 19 記載の抗体。

(21) 抗体の H 鎖 V 領域が配列番号 24 記載のアミノ酸配列を含み、L 鎖 V 領域が配列番号 25 記載のアミノ酸配列を含む請求項 20 記載の抗体。

(22) 抗体の H 鎖 V 領域が配列番号 26 記載のアミノ酸配列を含み、L 鎖 V 領域が配列番号 27 記載のアミノ酸配列を含む請求項 20 記載の抗体。

(23) 抗体 H 鎖 C 領域がヒト抗体 IgG1 サブクラスである請求項 21 記載の抗体 KM1399。

(24) 抗体 H 鎖 C 領域がヒト抗体 IgG4 サブクラスである請求項 21 記載の抗体 KM7399。

(25) 請求項 23 記載の抗体を生産する形質転換株 KM1399 (FERM BP-5650)。

(26) 請求項 24 記載の抗体を生産する形質転換株 KM7399 (FERM BP-5649)。

(27) ヒト化抗体がヒト型 CDR 移植抗体である請求項 15 記載の抗体。

(28) ヒト型 CDR 移植抗体がヒトの抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR 配列をヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域の CDR 配列でそれぞれ置換した CDR 移植抗体である請求項 17 記載の抗体。

(29) 抗体の H 鎖 V 領域の CDR 配列が請求項 8 記載のモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の CDR 配列を含み、L 鎖 V 領域の CDR 配列が請求項 8 記載のモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の CDR 配列を含む請求項 28 記載の抗体。



(30) 抗体のH鎖V領域のCDR配列が請求項10記載のモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR配列を含み、L鎖V領域のCDR配列が請求項10記載のモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR配列を含む請求項28記載の抗体。

(31) 抗体H鎖C領域がヒト抗体IgG1サブクラスである請求項29記載の抗体KM8399。

(32) 抗体H鎖C領域がヒト抗体IgG4サブクラスである請求項29記載の抗体KM9399。

(33) 請求項31記載の抗体を生産する形質転換株KM8399(FERM BP-5648)。

(34) 請求項32記載の抗体を生産する形質転換株KM9399(FERM BP-5647)。

(35) タンデムカセットベクターpKANTEX93。

(36) タンデムカセットベクターpKANTEX93を含有する形質転換体を用いたヒト化抗体の製造法。

(37) 抗体が一本鎖抗体である請求項2記載の抗体。

(38) ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖のN末アミノ酸から1～313番目に存在するエピトープを認識し、ヒトインターロイキン5の生物活性を抑制する請求項37記載の一本鎖抗体。

(39) 一本鎖抗体が、ヒト化抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む請求項38記載の抗体。

(40) H鎖V領域およびL鎖V領域のCDR配列が請求項8記載のモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR配列を含む請求項38記載の一本鎖抗体。

(41) H鎖V領域およびL鎖V領域のCDR配列が請求項10記載のモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR配列を含む請求項38記載の一本鎖抗体。

(42) 抗体がジスルフィド安定化抗体である請求項2記載の抗体。

(43) ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖のN末アミノ酸から1～313番目に存在するエピトープを認識し、かつヒトインターロイキン5の生物活性を抑制する請求項42記載のジスルフィド安定化抗体。

(44) ジスルフィド安定化抗体が、ヒト化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域を含む請求項 43 記載の抗体。

(45) H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR 配列が請求項 8 記載のモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR 配列を含む請求項 43 記載のジスルフィド安定化抗体。

(46) H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR 配列が請求項 10 記載のモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR 配列を含む請求項 43 記載の一本鎖抗体。

(47) ヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖に反応性を有する請求項 6、8 または 10 記載のモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域または L 鎖 V 領域の CDR 配列を含むペプチド。

(48) ヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白として発現可能なベクターを宿主細胞に導入し、培養発現させ、単離、精製して得られる蛋白質からなるヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖抗原。

(49) 配列番号 91 記載のアミノ酸配列を有する、請求項 48 記載のヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖抗原。

(50) 請求項 1～11、15～24、27～32 および 37～46 記載の抗体を用いてヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖を免疫学的に検出する方法。

(51) 請求項 1～11、15～24、27～32 および 37～46 記載の抗体を用いてヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

(52) 請求項 1～11、15～24、27～32 および 37～46 記載の抗体を用いてヒト好酸球を免疫学的に検出する方法。

(53) 請求項 1～11、15～24、27～32 および 37～46 記載の抗体を用いて可溶性ヒトインターロイキン 5 受容体  $\alpha$  鎖を免疫学的に検出および定量する方法。

(54) 請求項 1～11、15～24、27～32 および 37～46 記載の

抗体による好酸球増多の予防方法。

(55) 請求項 1 ～ 1 1、1 5 ～ 2 4、2 7 ～ 3 2 および 3 7 ～ 4 6 記載の抗体による慢性気管支喘息などのアレルギー性疾患の治療方法。

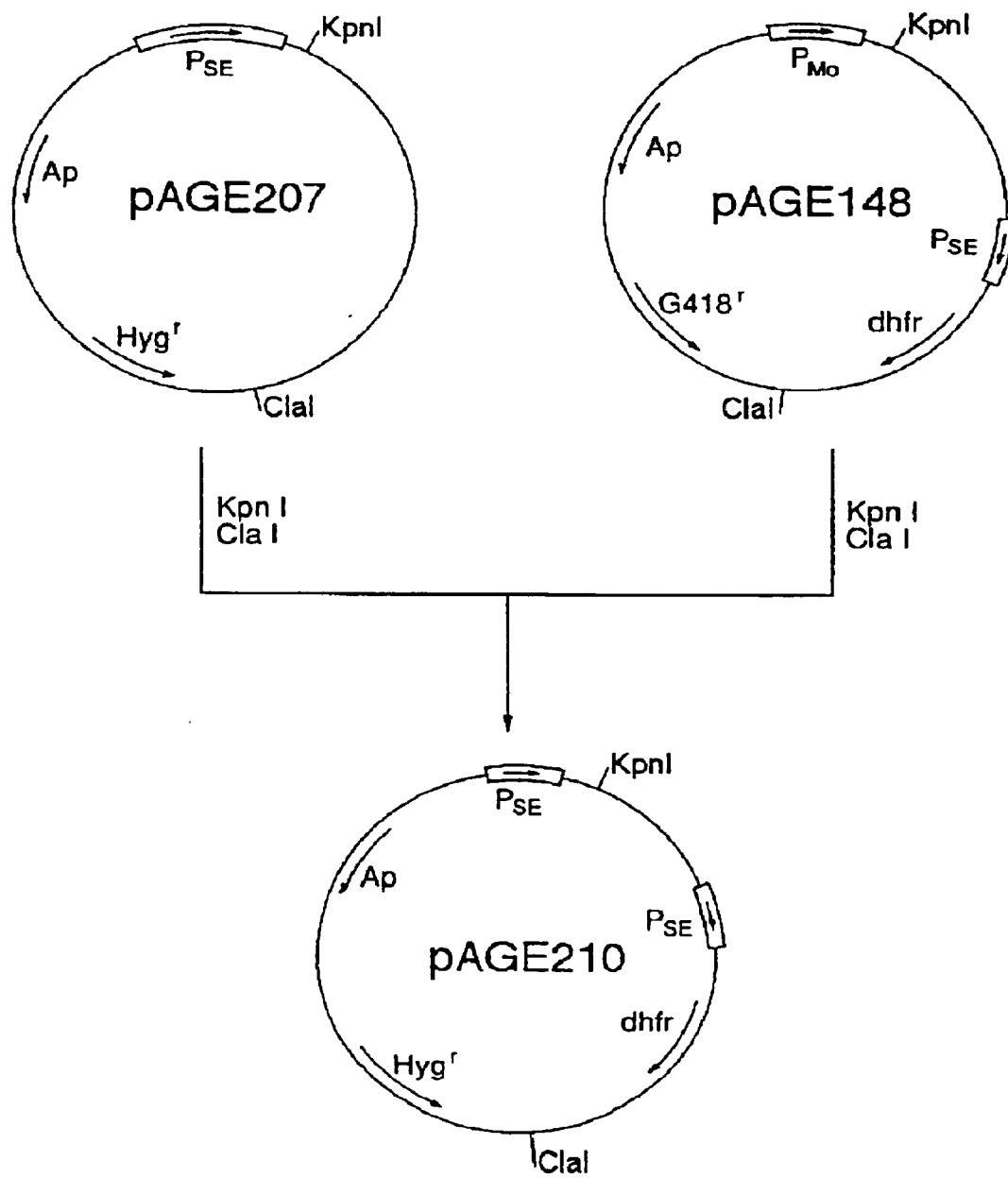
(56) 請求項 1 ～ 1 1、1 5 ～ 2 4、2 7 ～ 3 2 および 3 7 ～ 4 6 記載の抗体による好酸球増多を伴う疾患の治療方法。

(57) 請求項 1 ～ 1 1、1 5 ～ 2 4、2 7 ～ 3 2 および 3 7 ～ 4 6 記載の抗体を有効成分とする好酸球増多抑制剤。

(58) 請求項 1 ～ 1 1、1 6 ～ 2 4、2 7 ～ 3 2 および 3 7 ～ 4 6 記載の抗体を有効成分とするアレルギー性疾患治療剤。

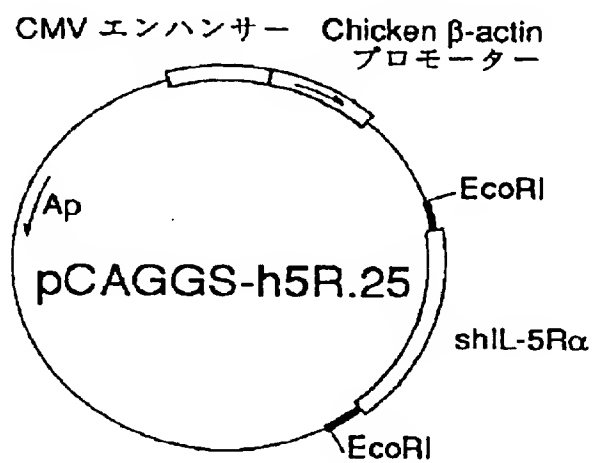
1 / 6 1

## 第 1 図



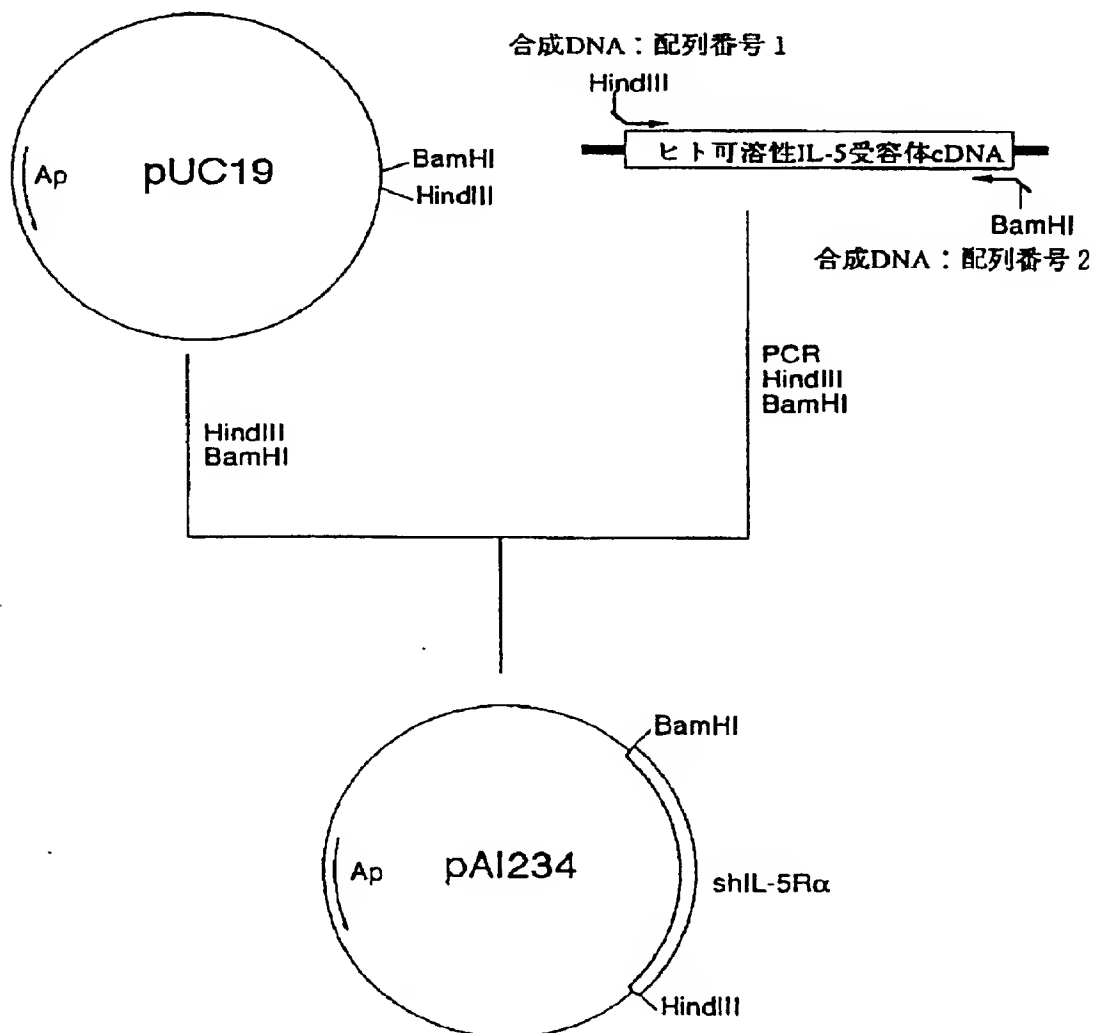
2 / 6 1

## 第 2 図



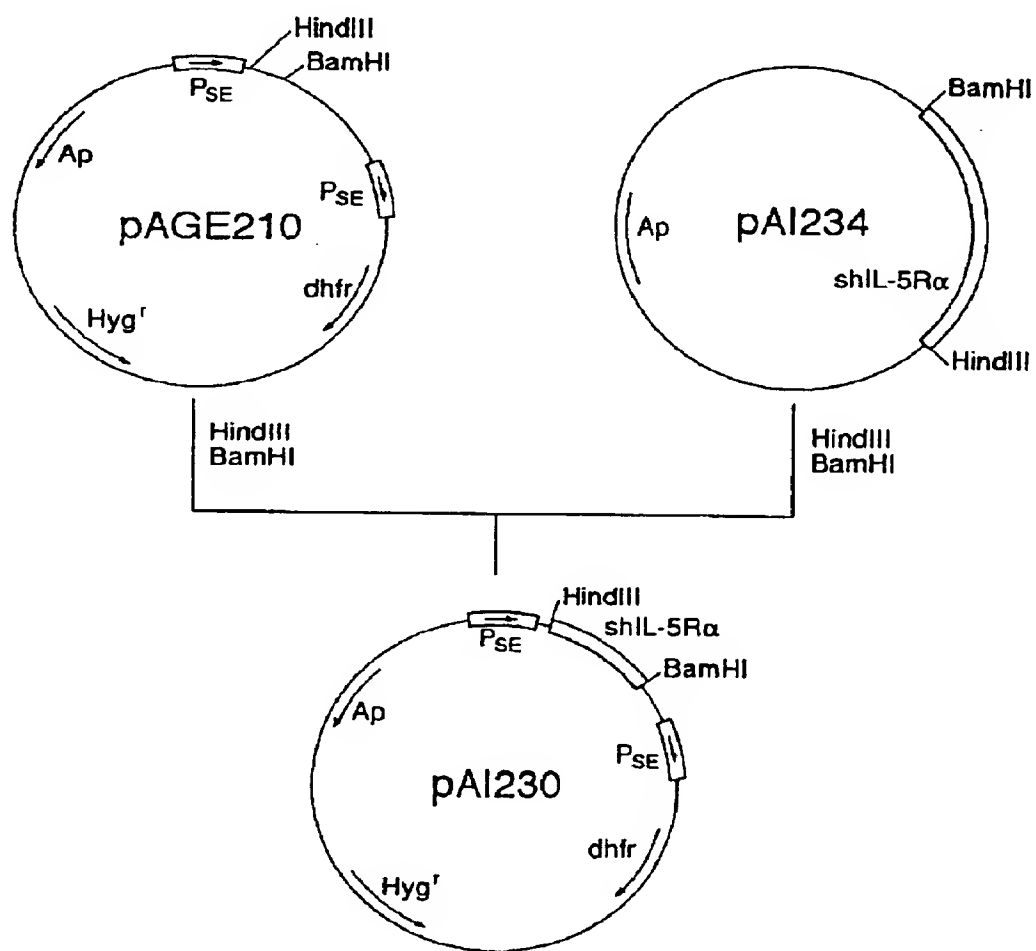
3 / 6 1

## 第 3 図



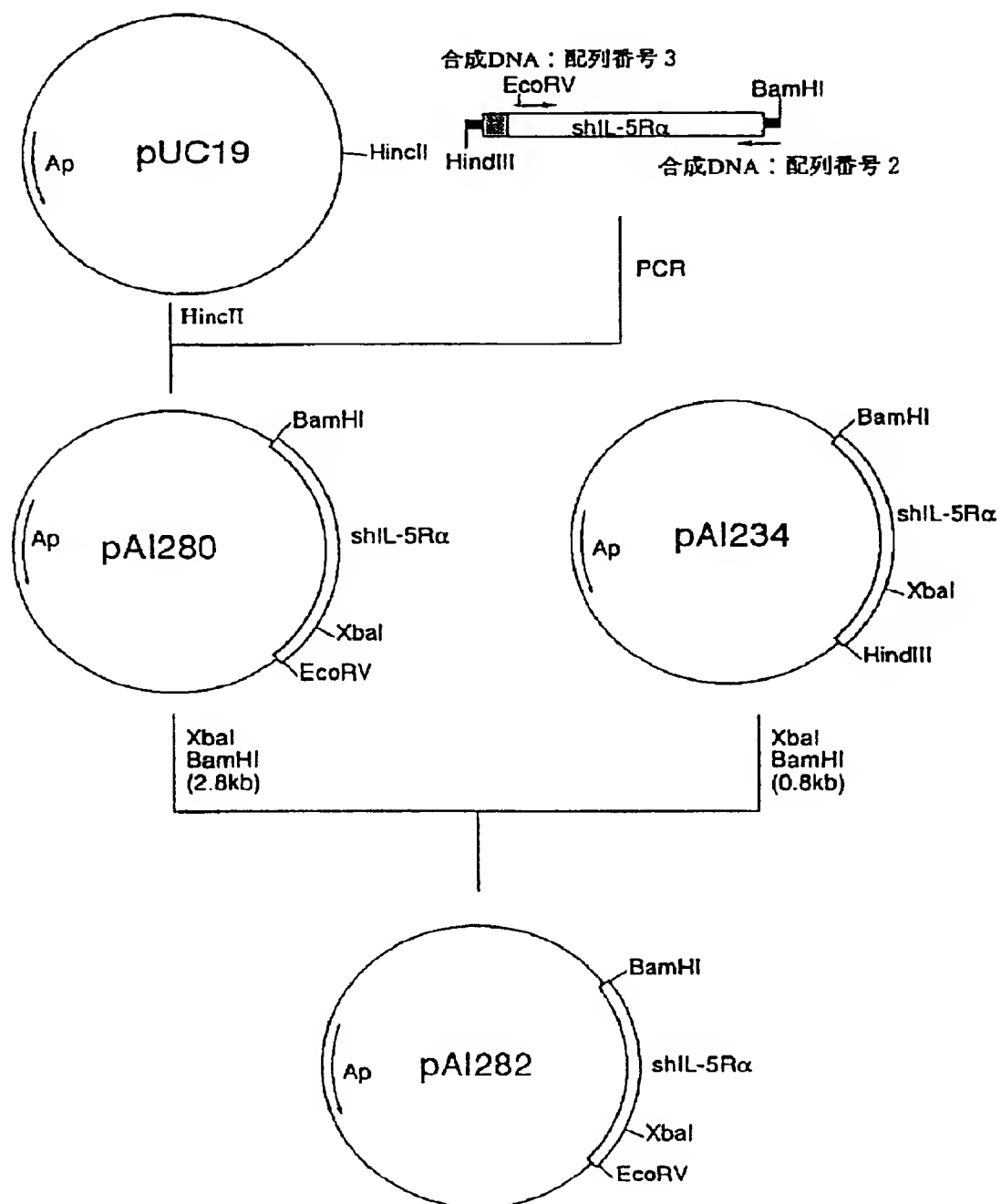
4 / 6 1

## 第 4 図



5 / 6 1

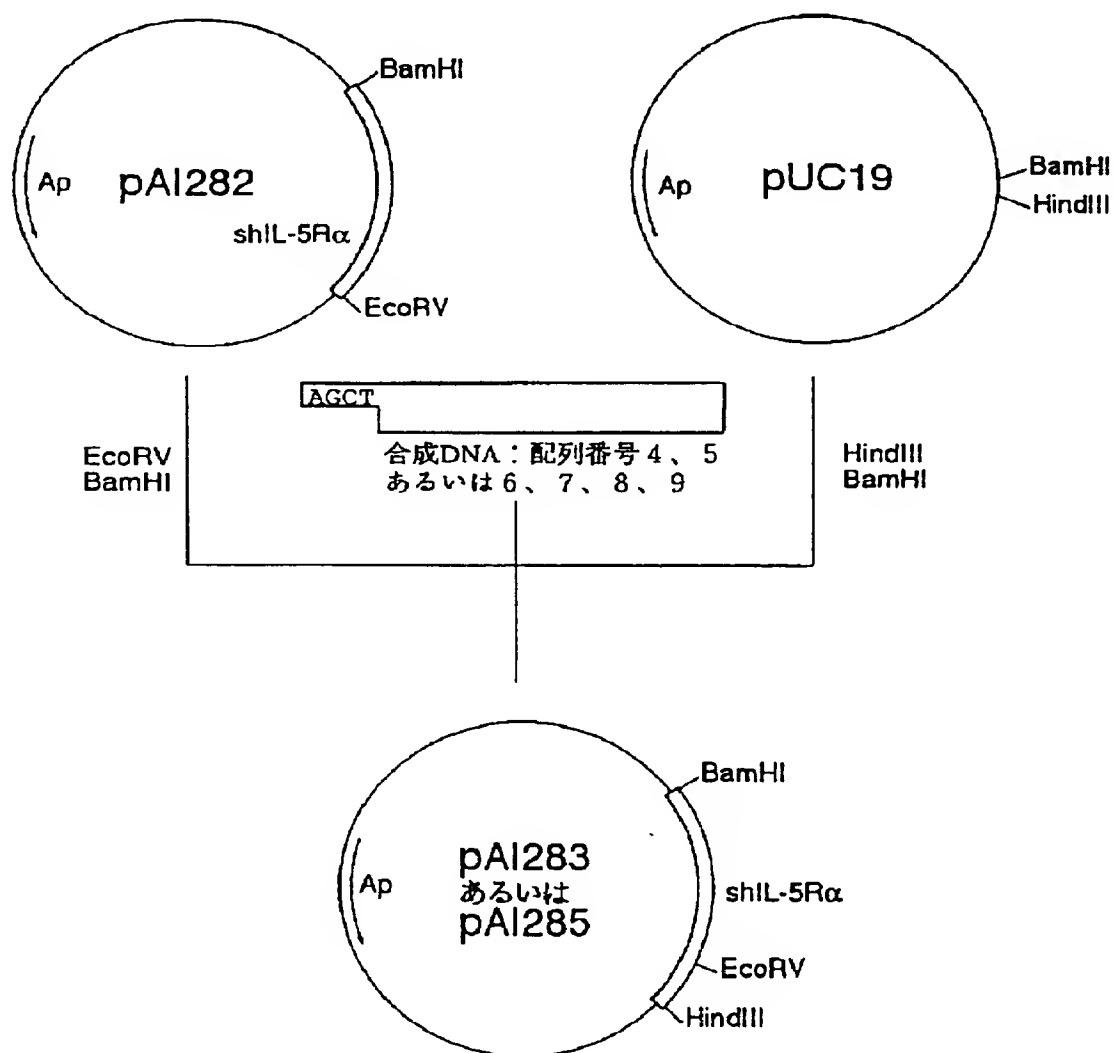
第 5 図





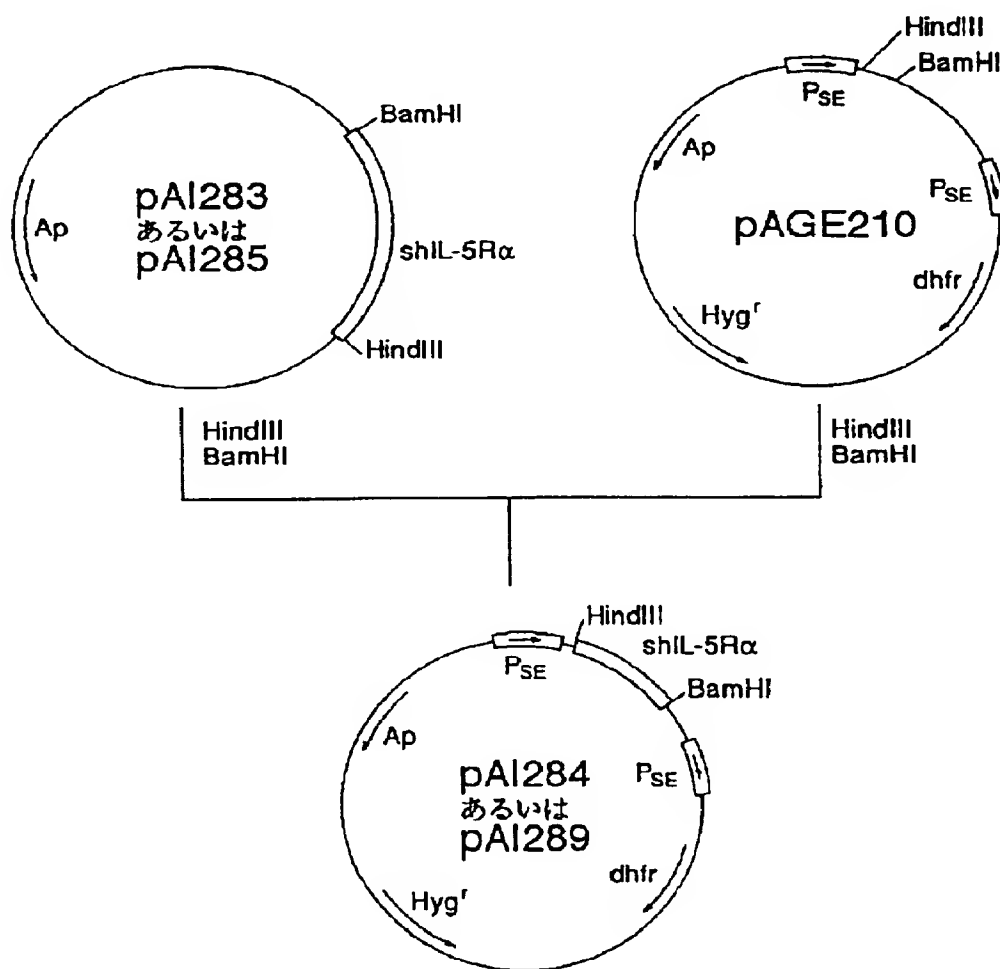
6 / 6 1

## 第 6 図



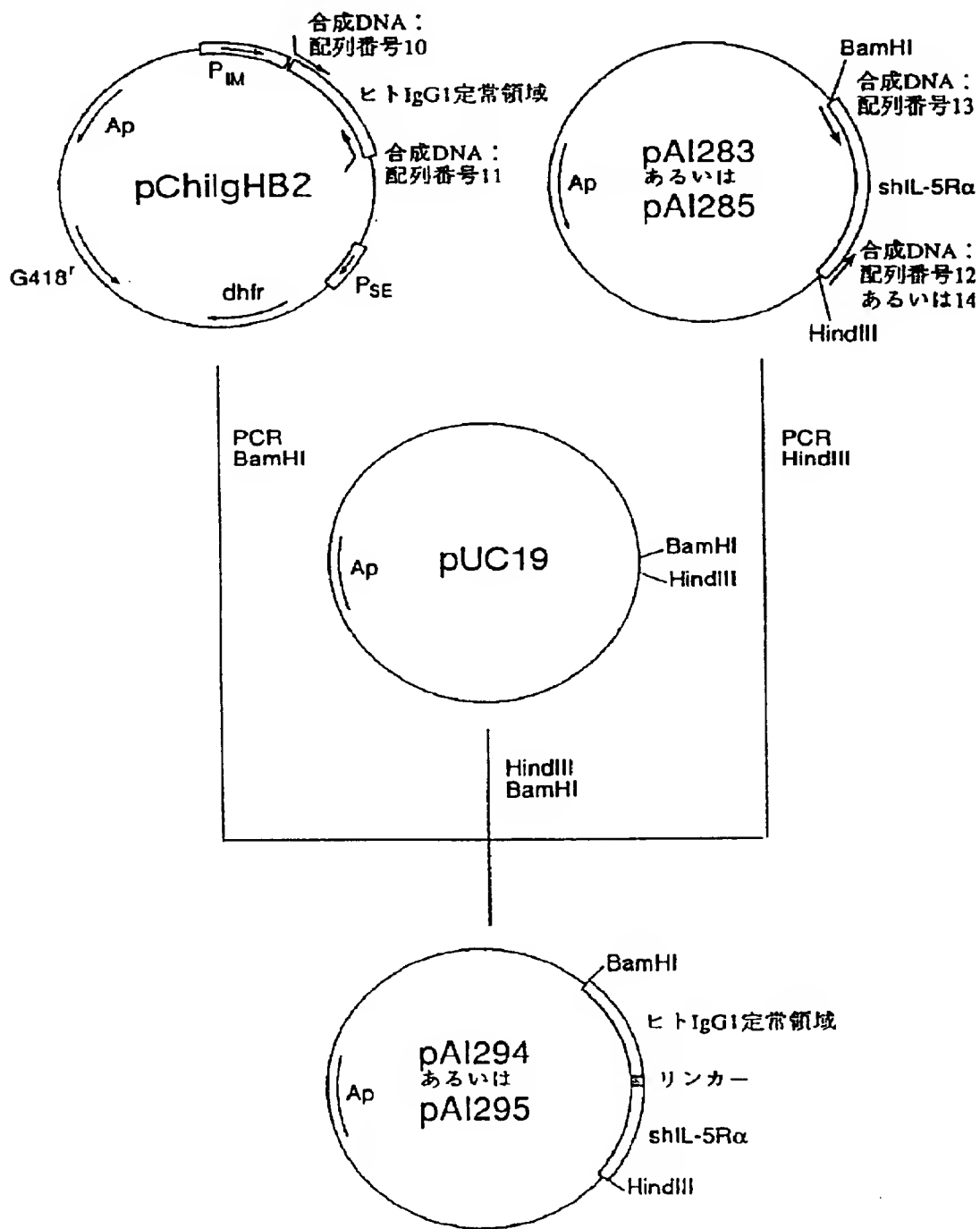
7 / 6 1

## 第 7 図



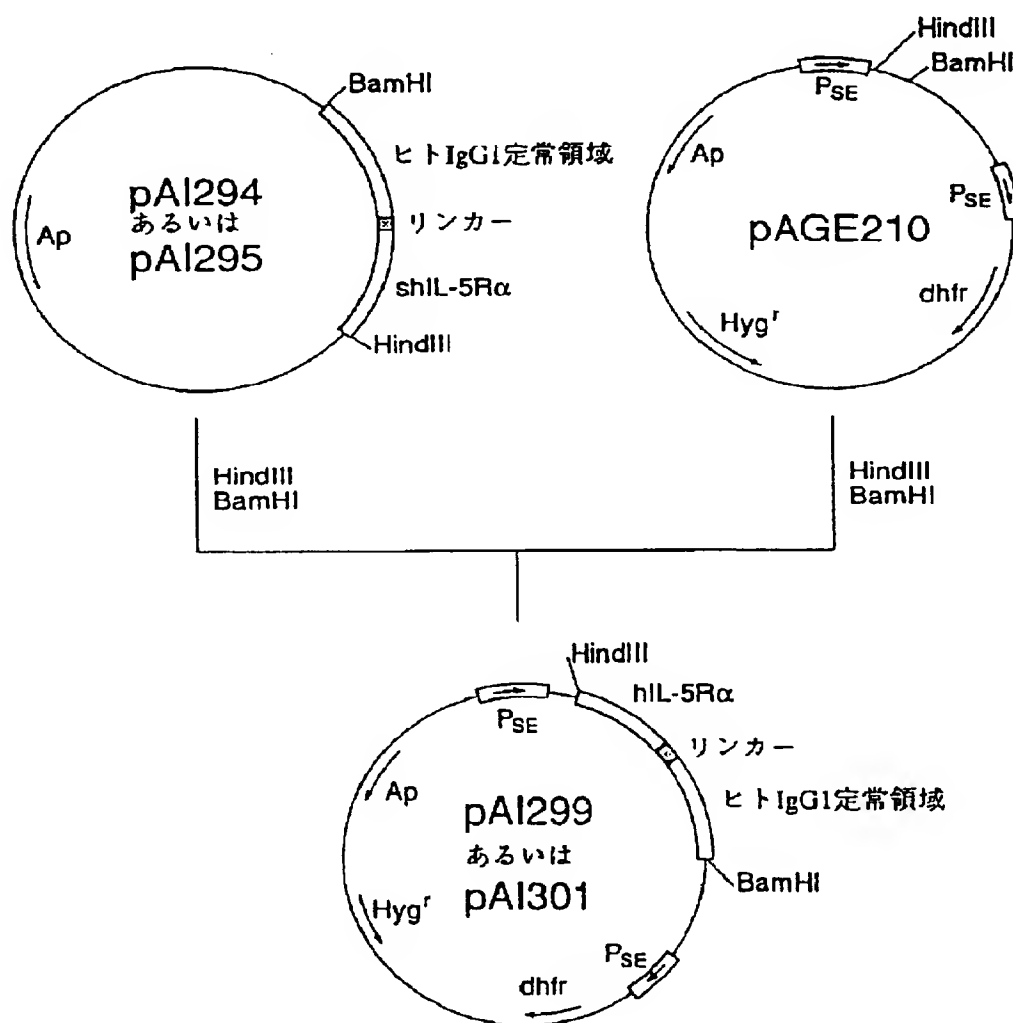
8 / 6 1

## 第 8 図



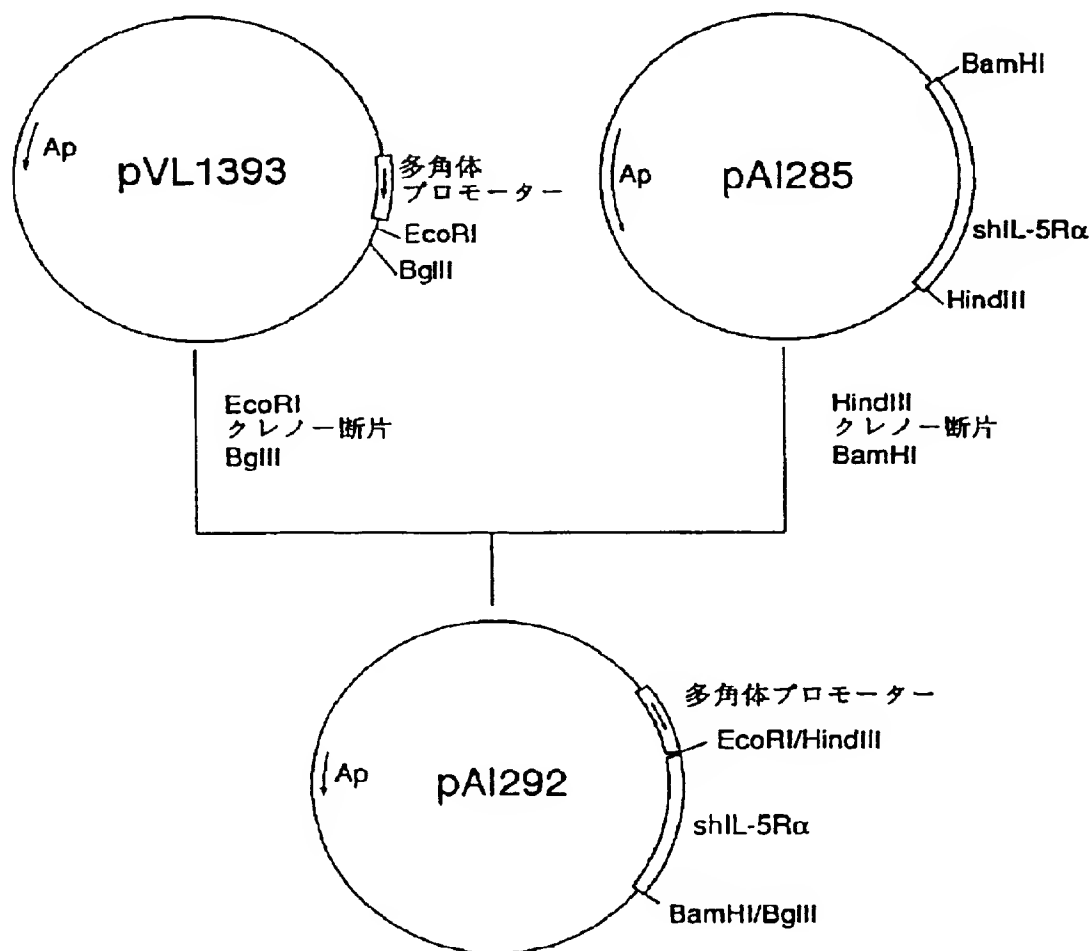
9 / 6 1

## 第 9 図



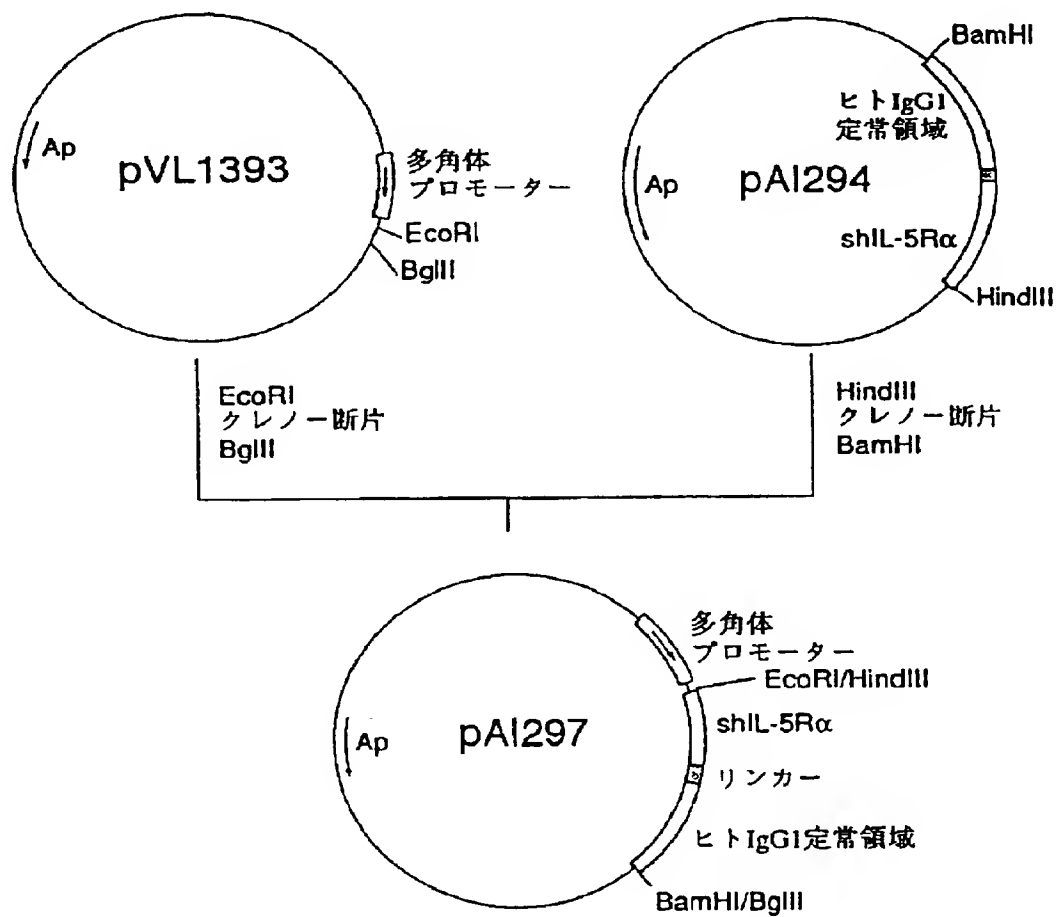
10/61

## 第 10 図



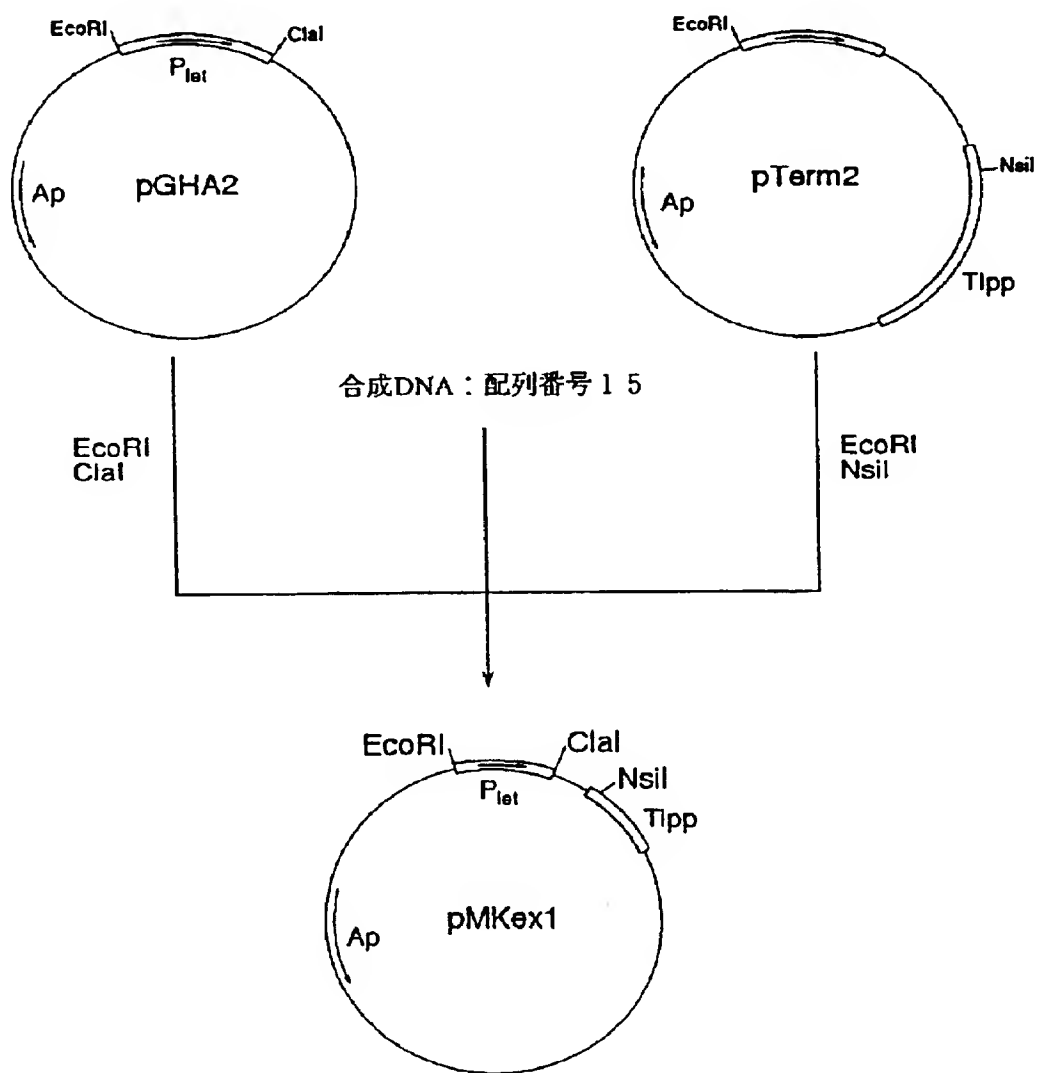
11/61

## 第 11 図



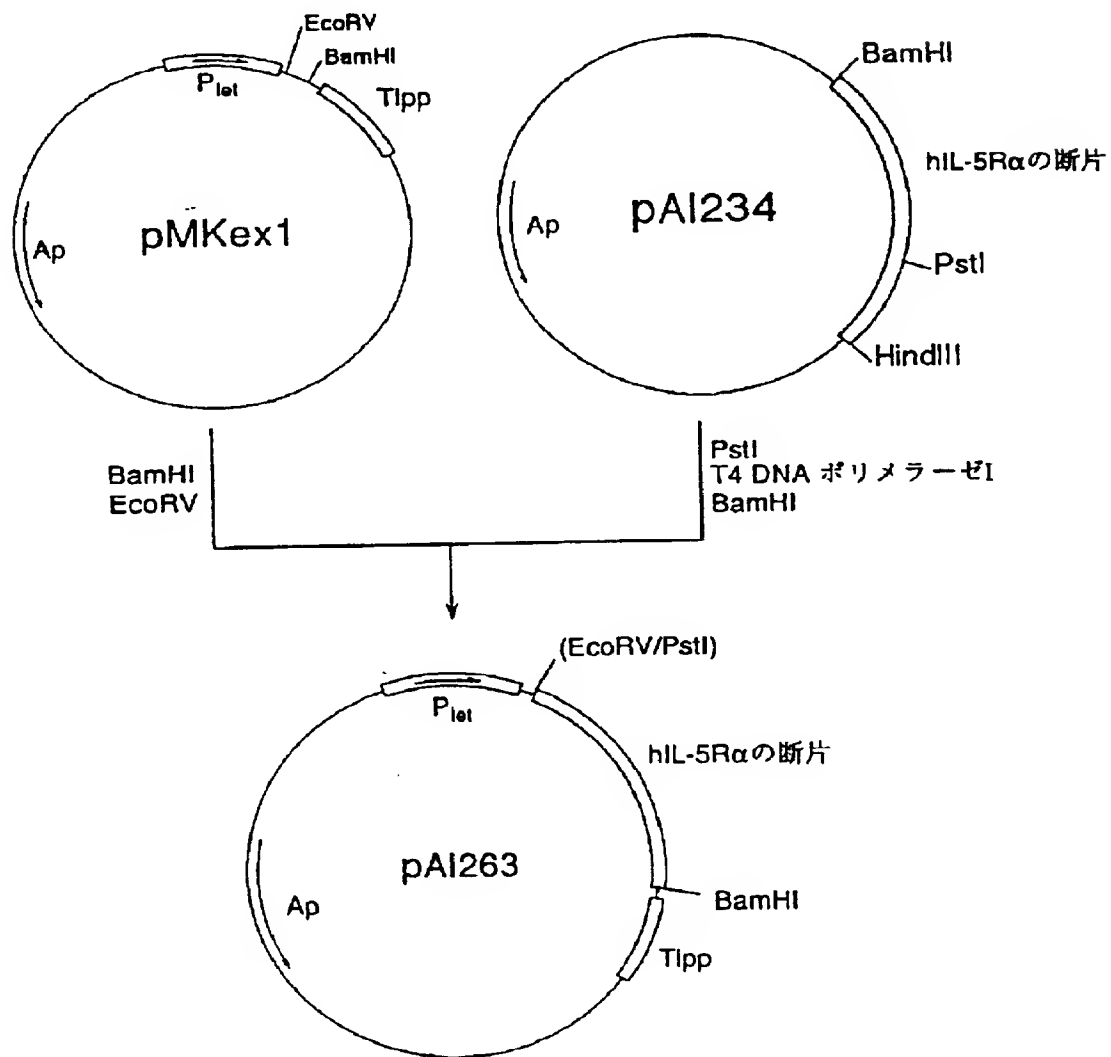
12/61

## 第 12 図



13/61

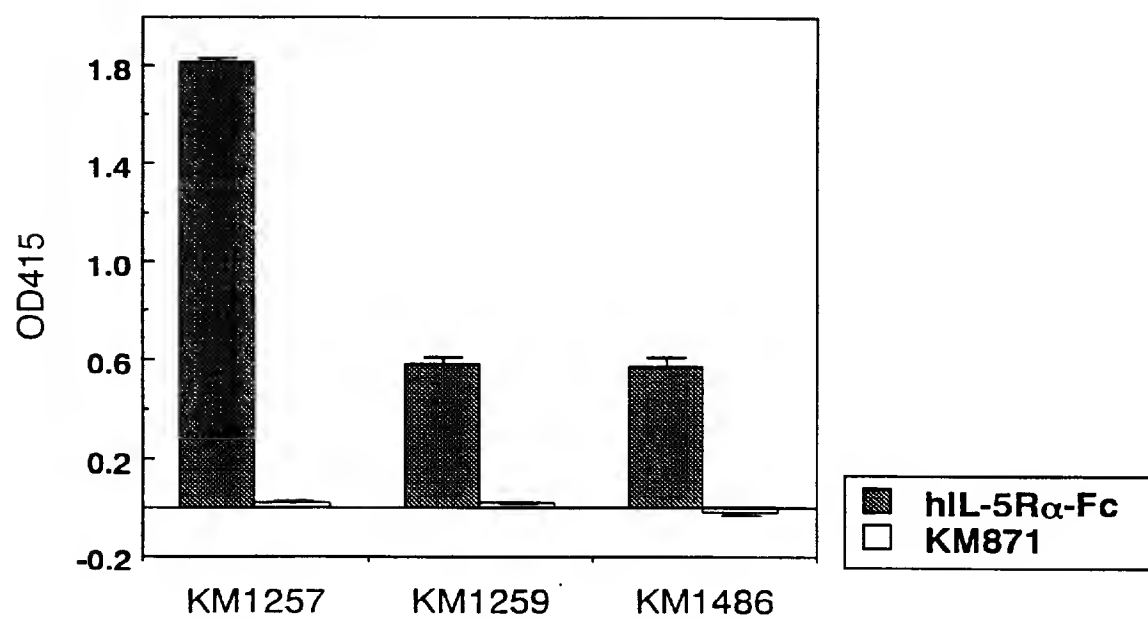
## 第 13 図





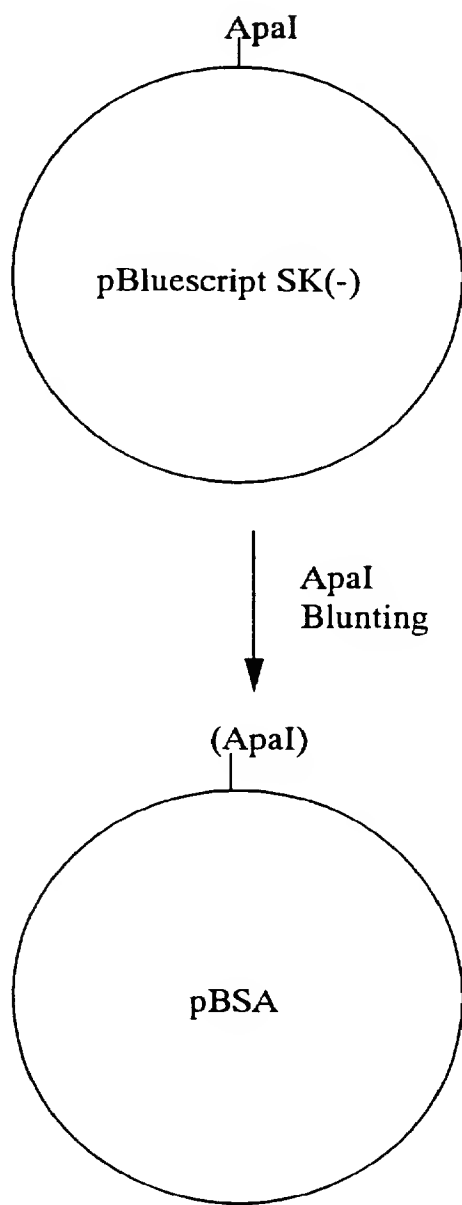
14/61

第 14 図



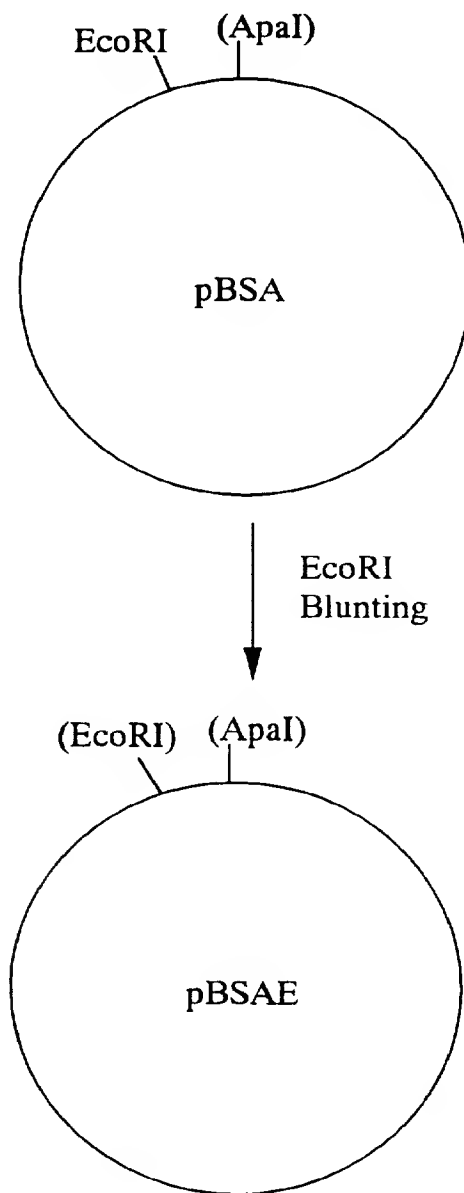
1 5 / 6 1

第 1 5 図



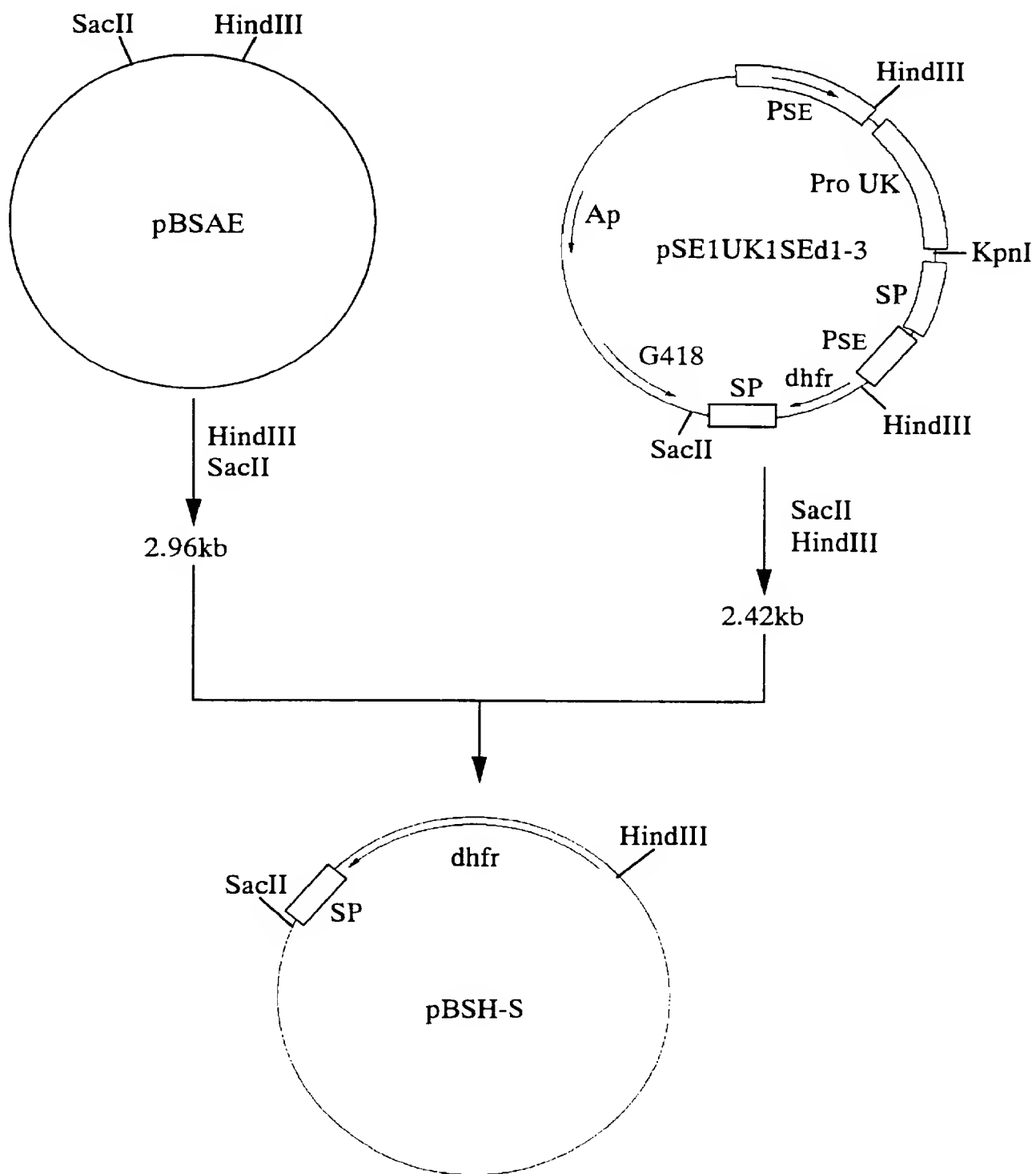
16 / 61

第 16 図



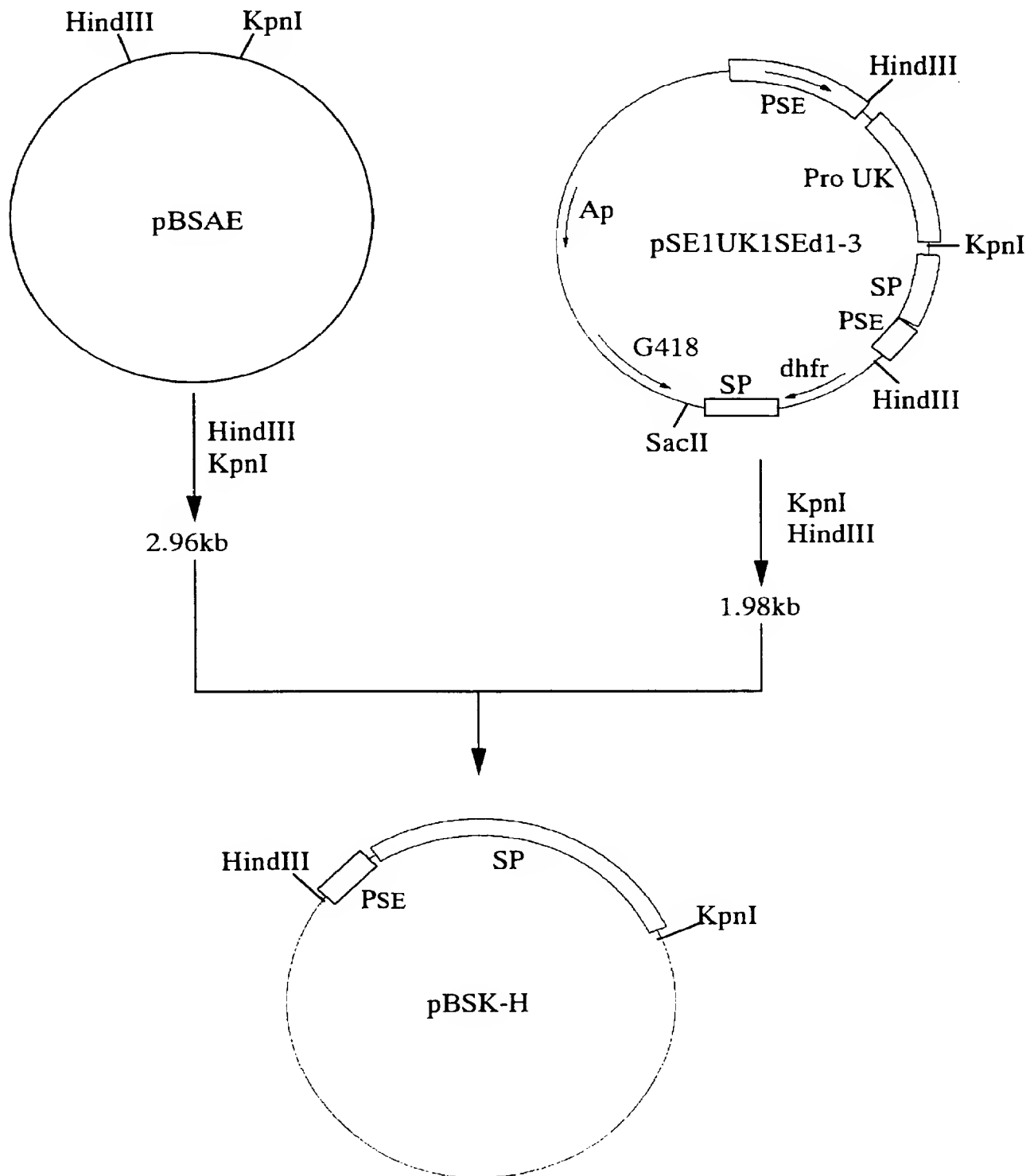
17 / 61

第 17 図



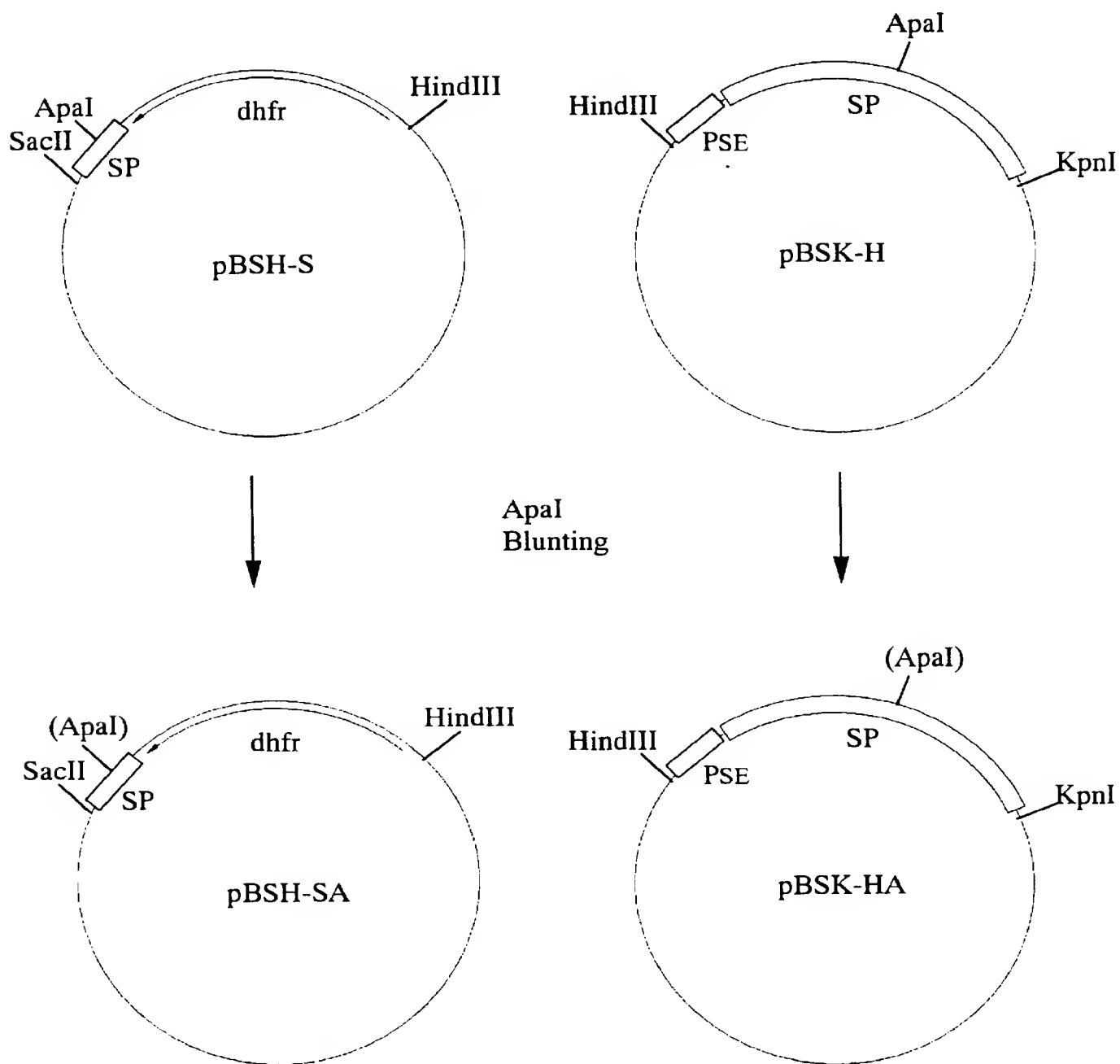
18 / 61

第 18 図



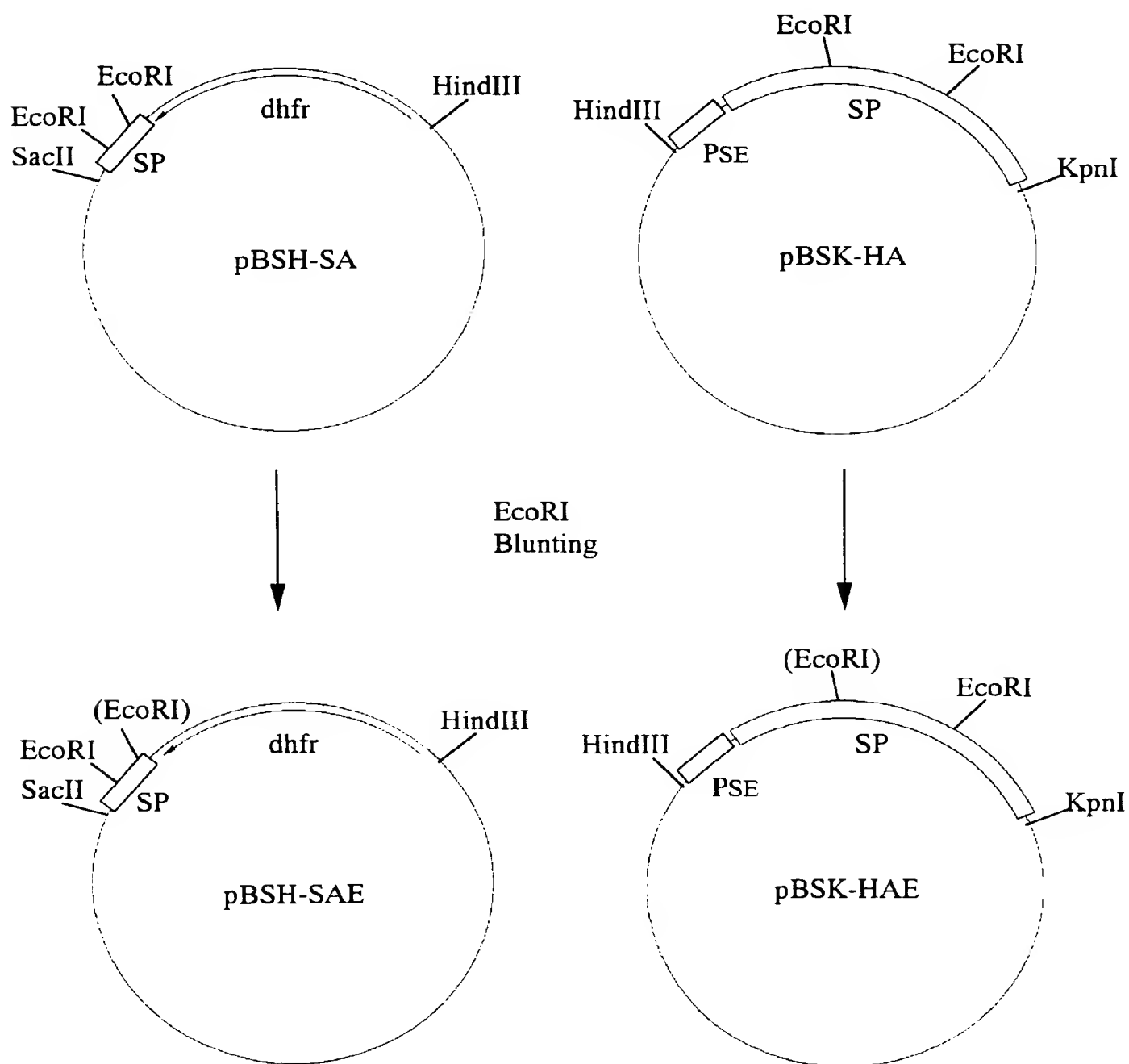
19/61

## 第 19 図



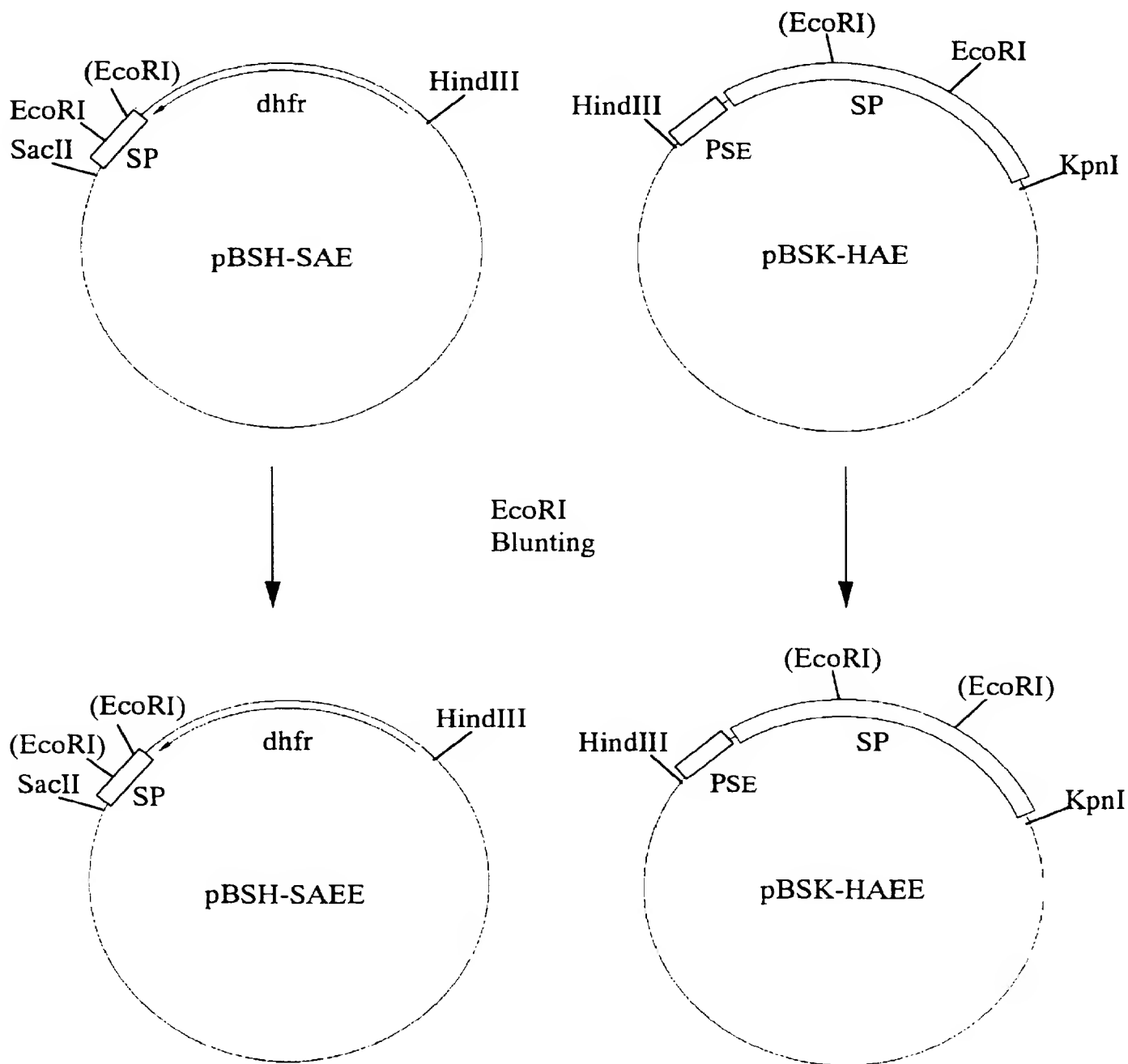
20/61

## 第 20 図



21 / 61

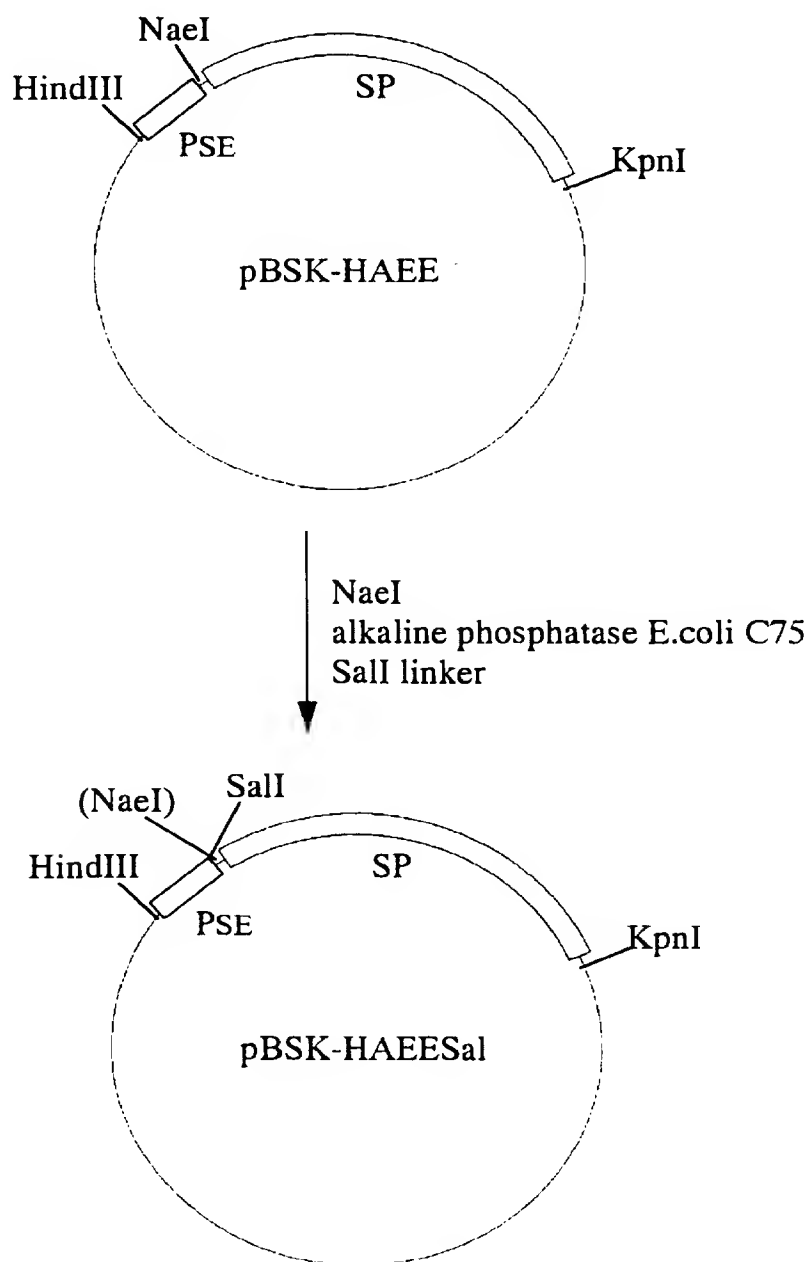
第 21 図





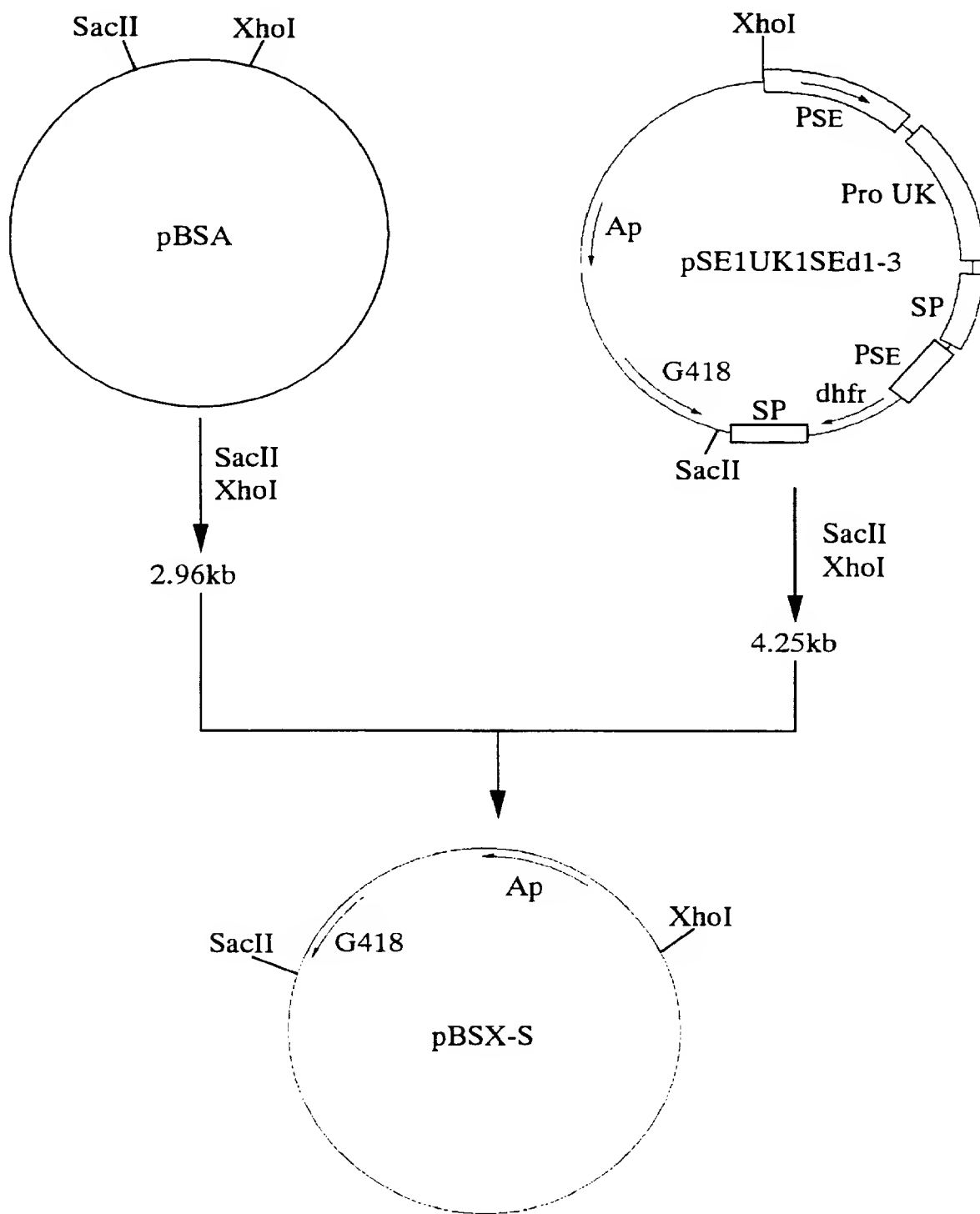
22/61

第 22 図



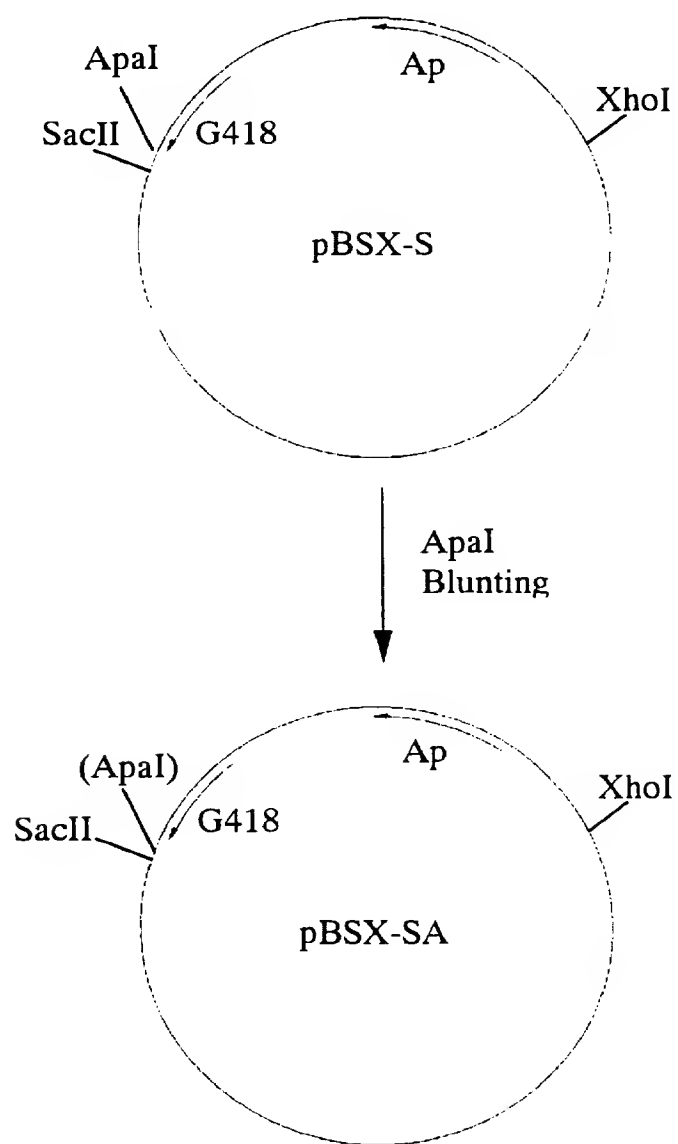
23 / 61

## 第 23 図



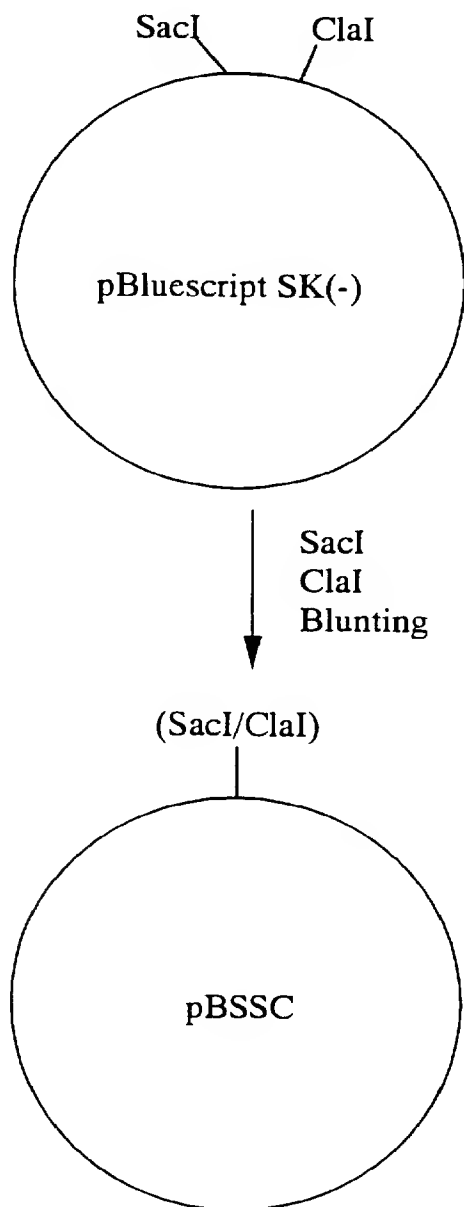
24 / 61

第 24 図



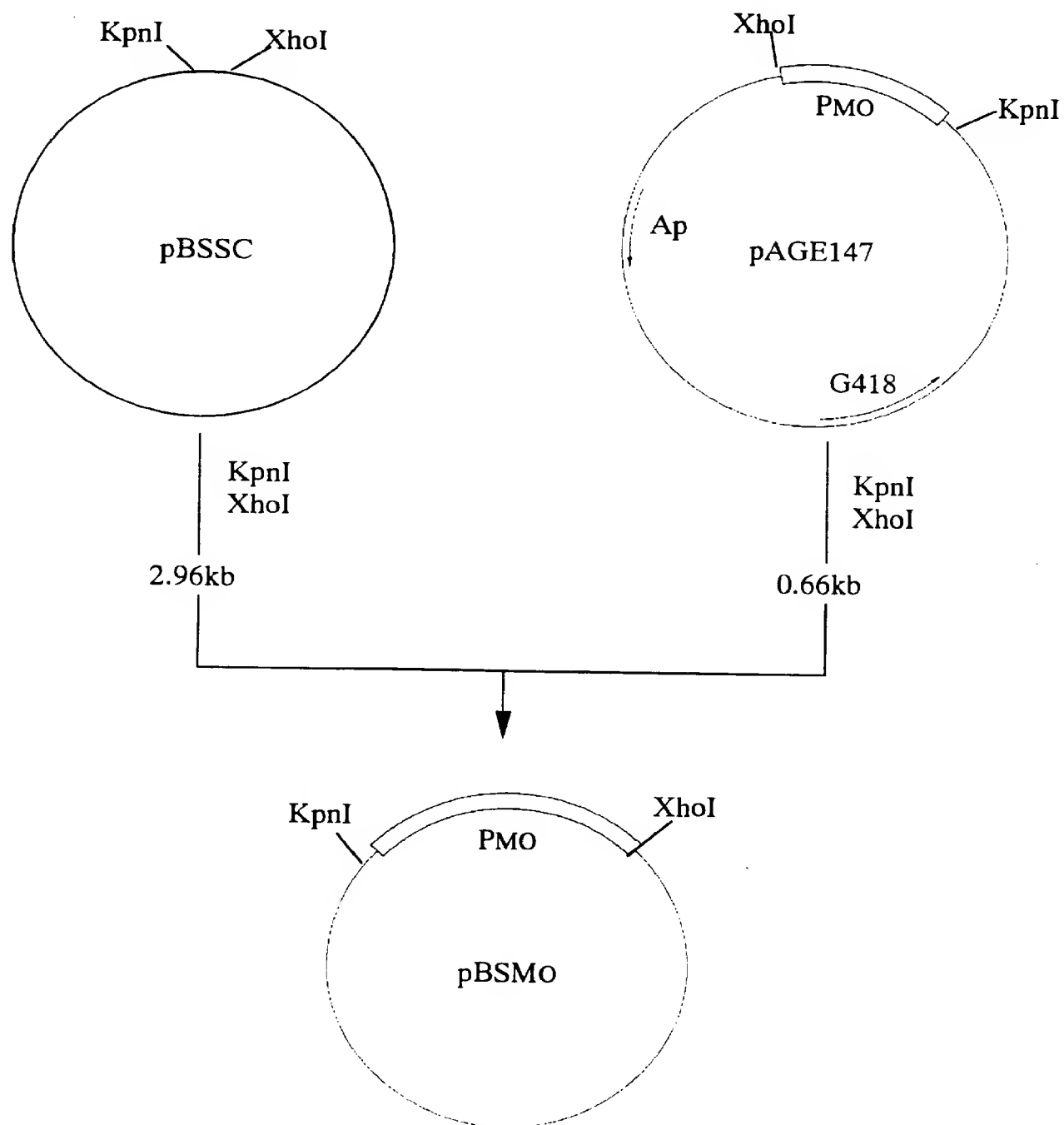
25 / 61

第 25 図



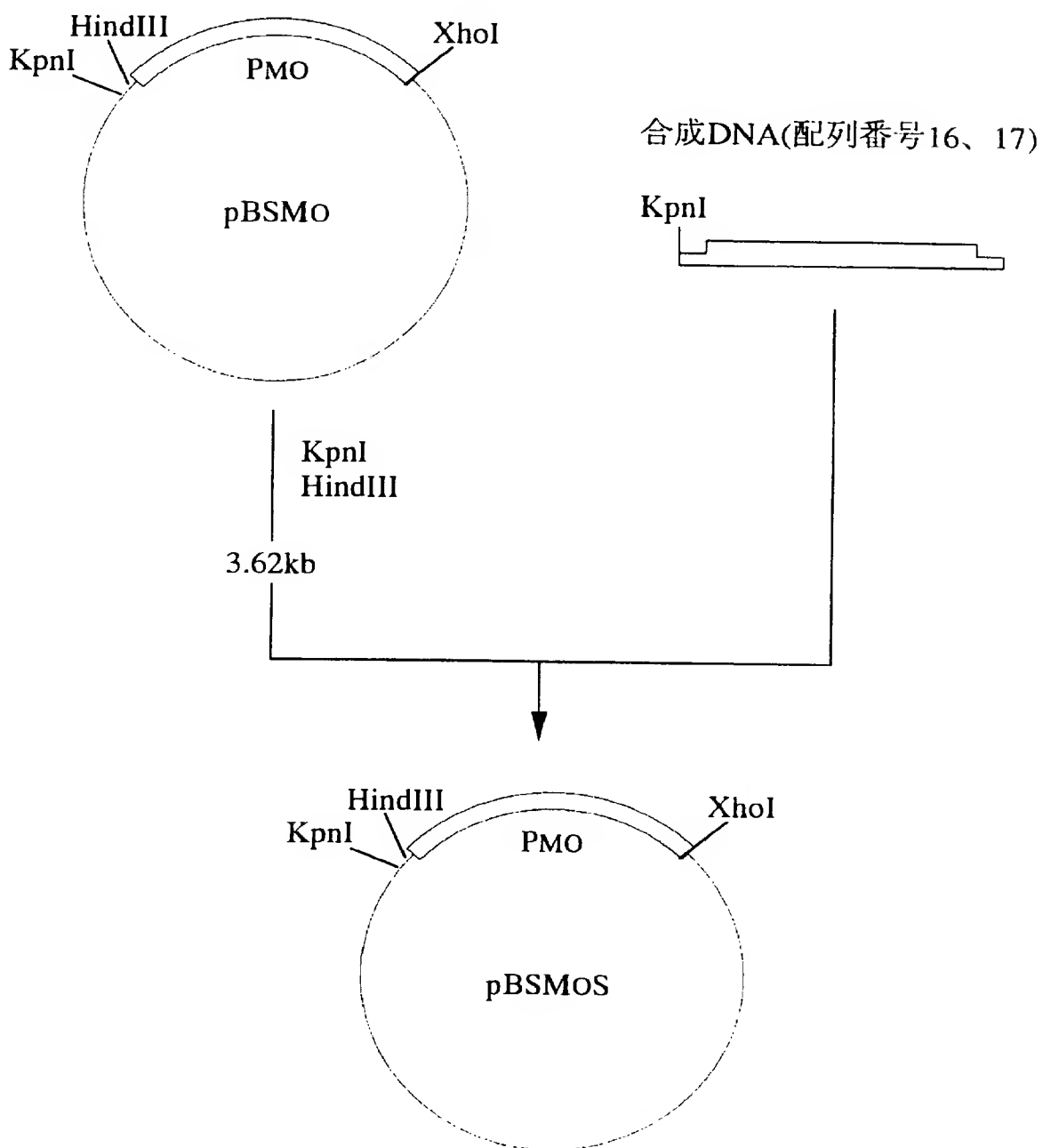
26 / 61

## 第 26 図



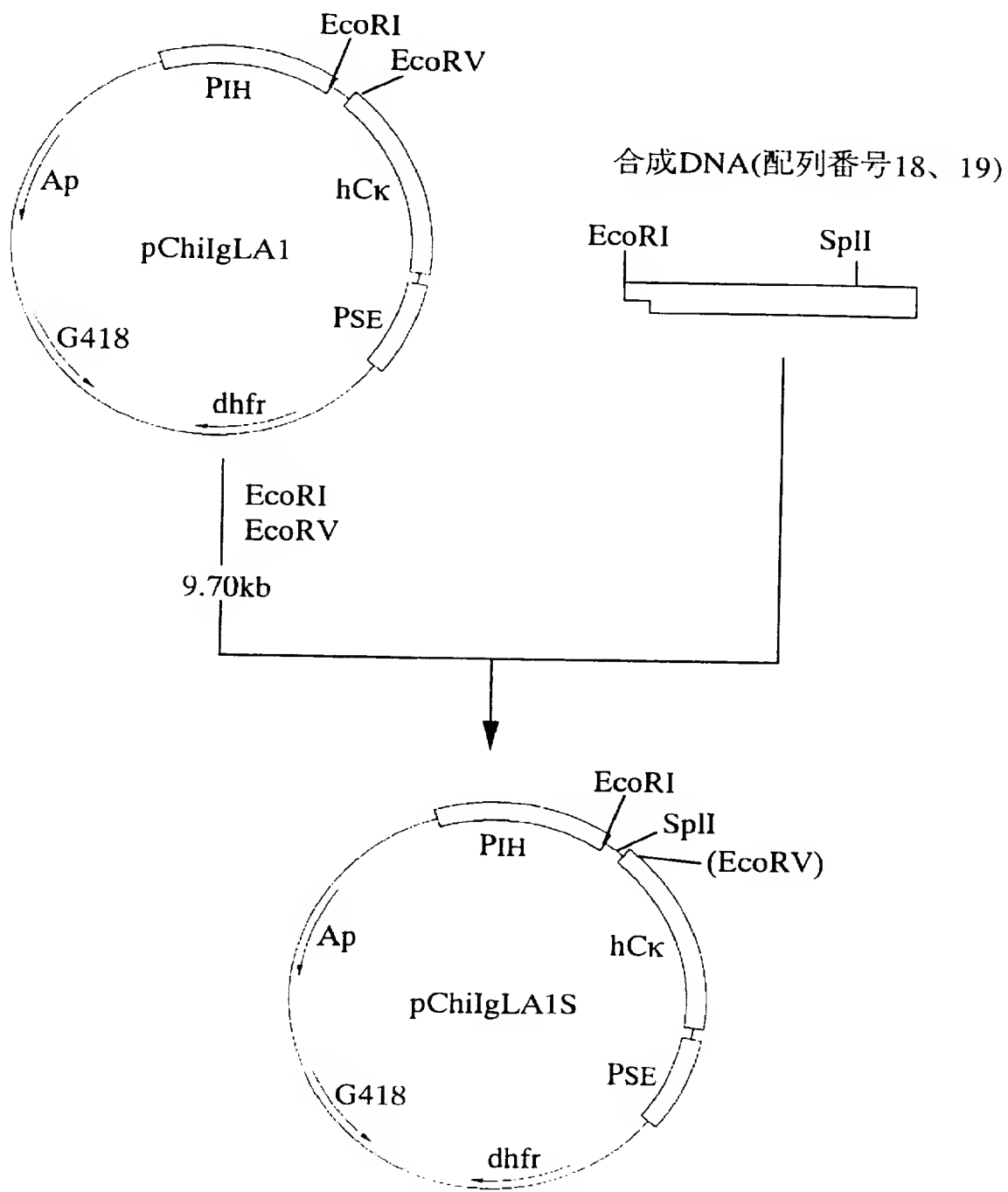
27 / 61

## 第 27 図



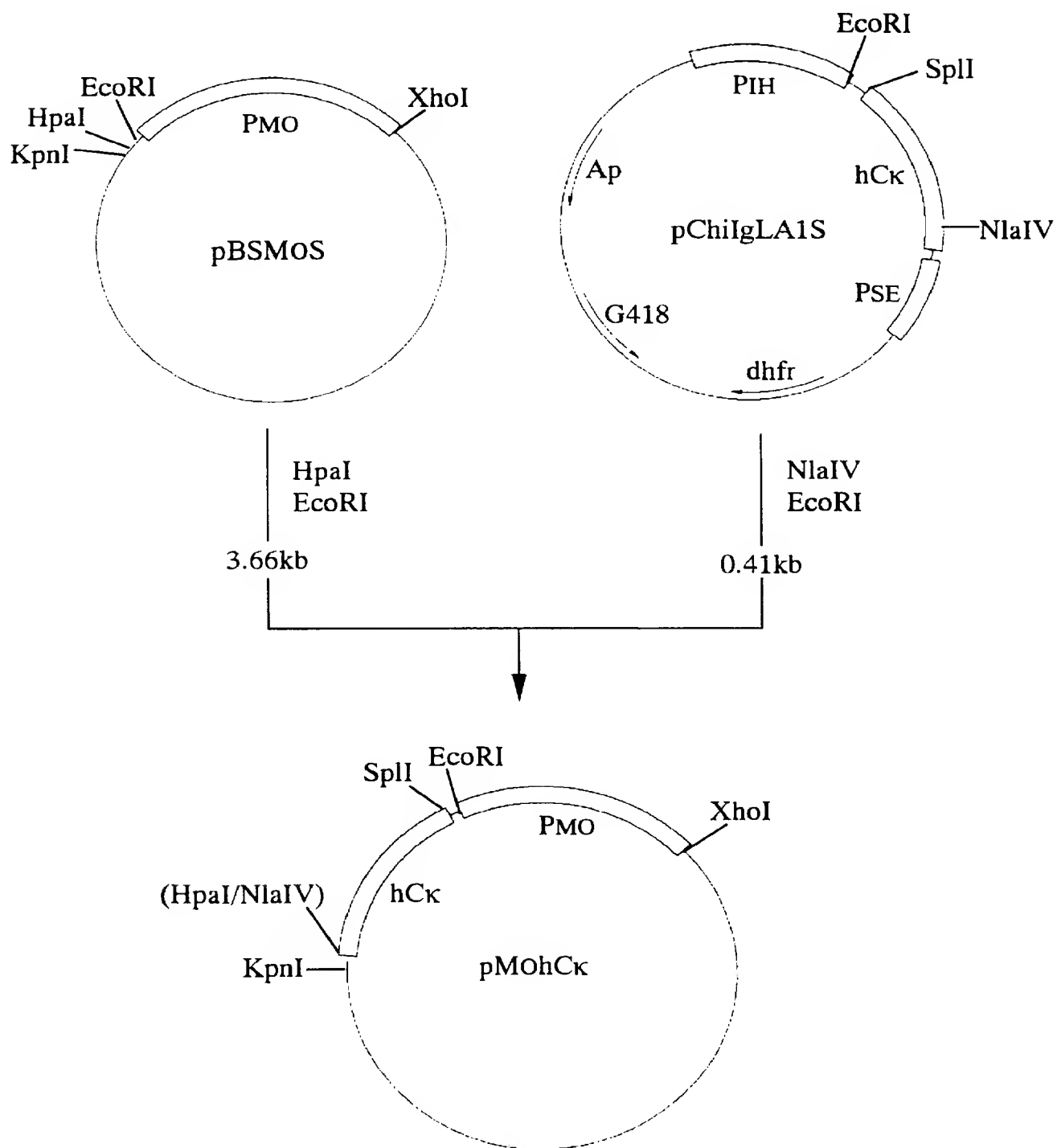
28 / 61

## 第 28 図



29 / 61

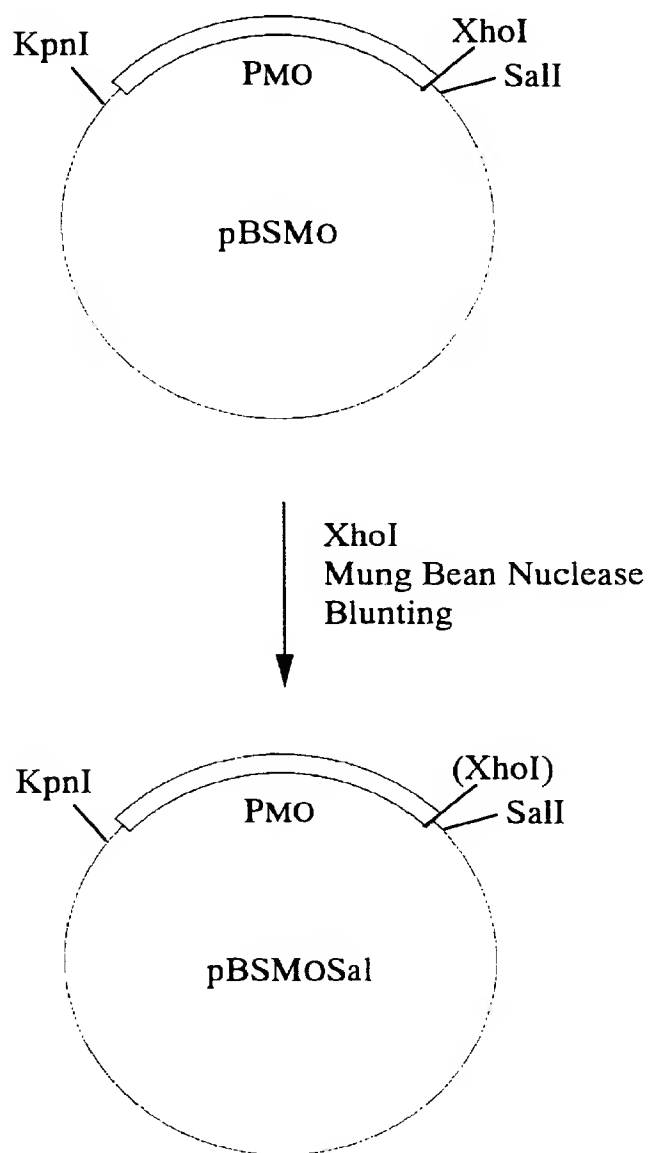
## 第 29 図





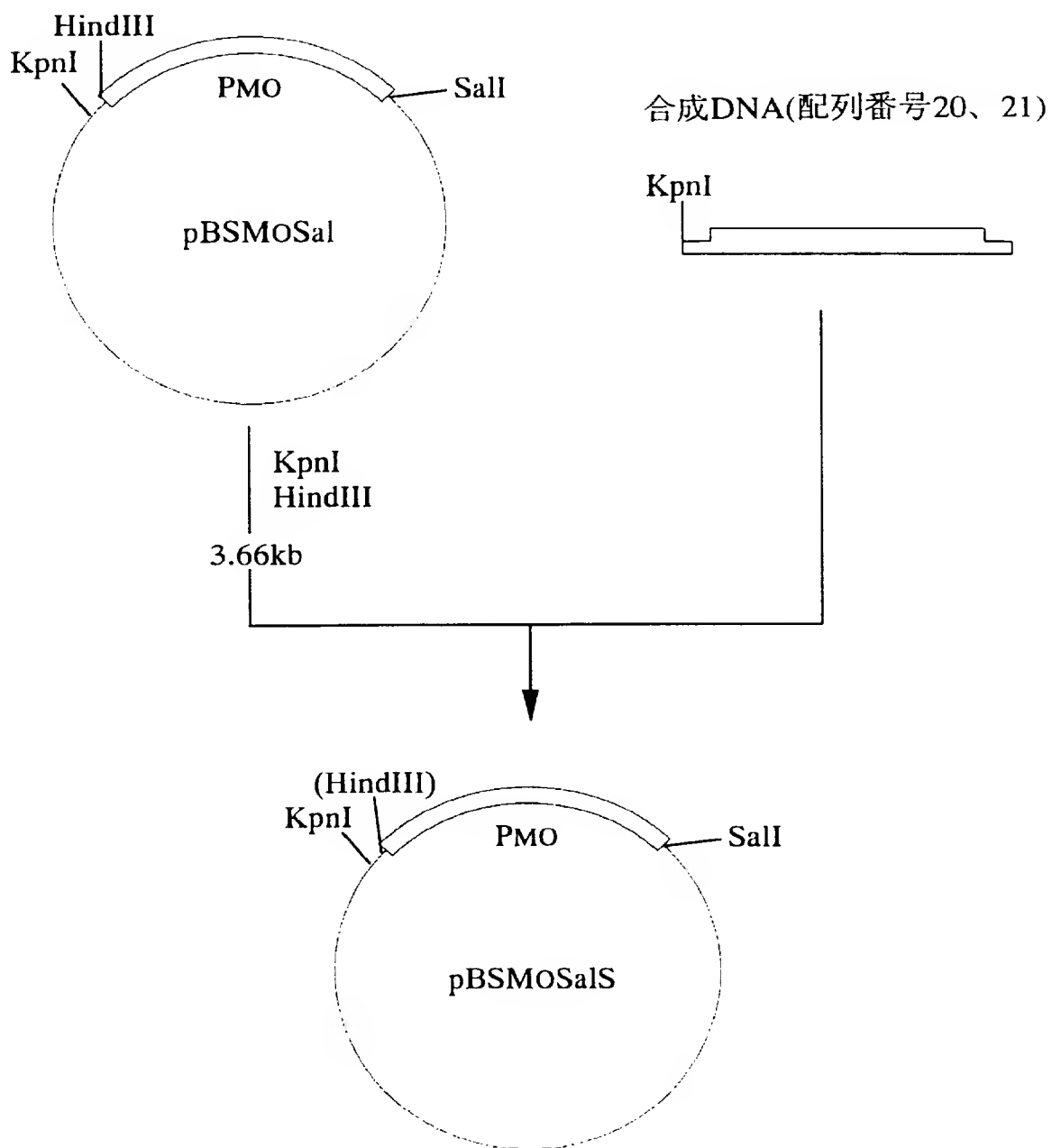
30 / 61

第 30 図



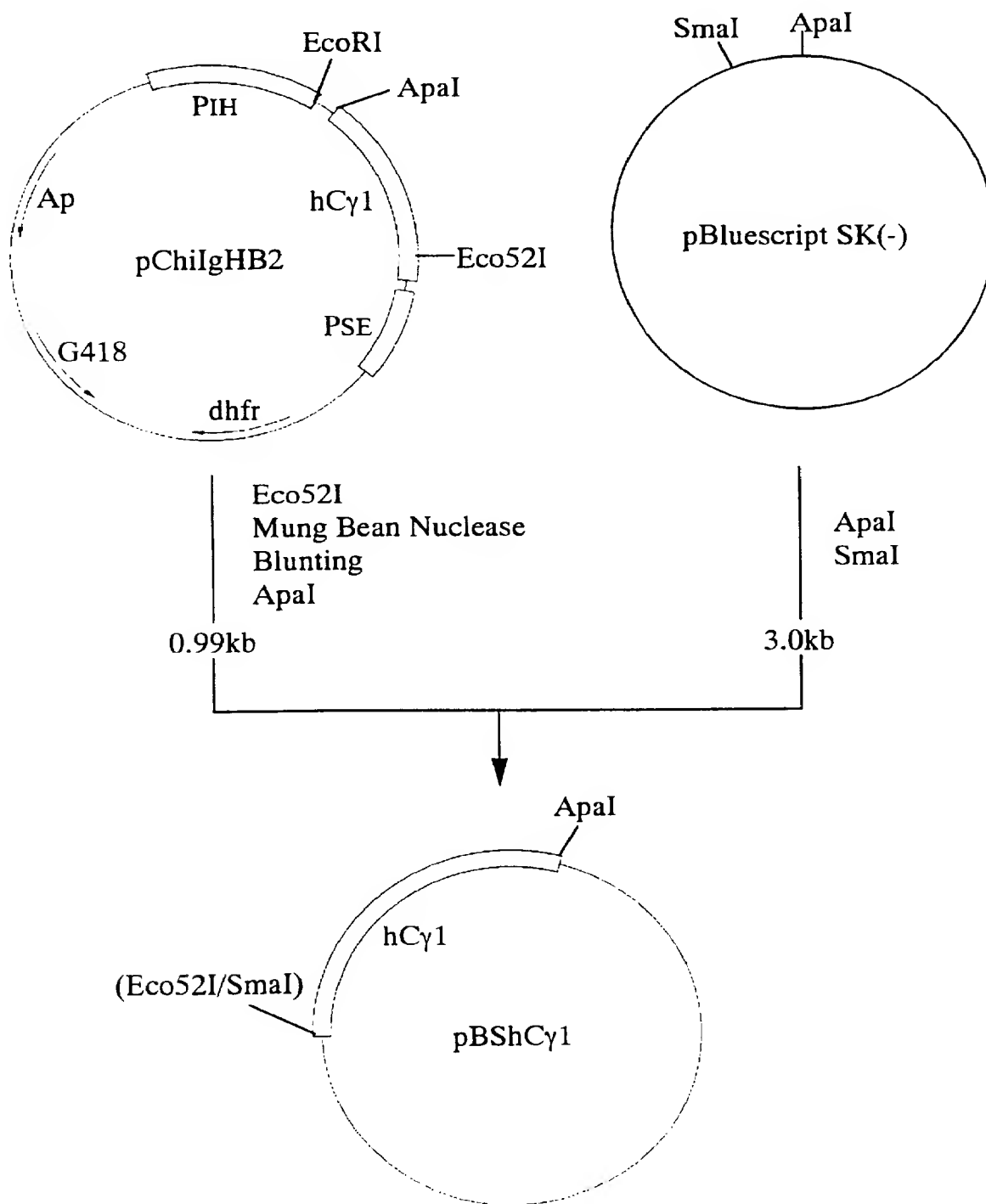
31 / 61

## 第 31 図



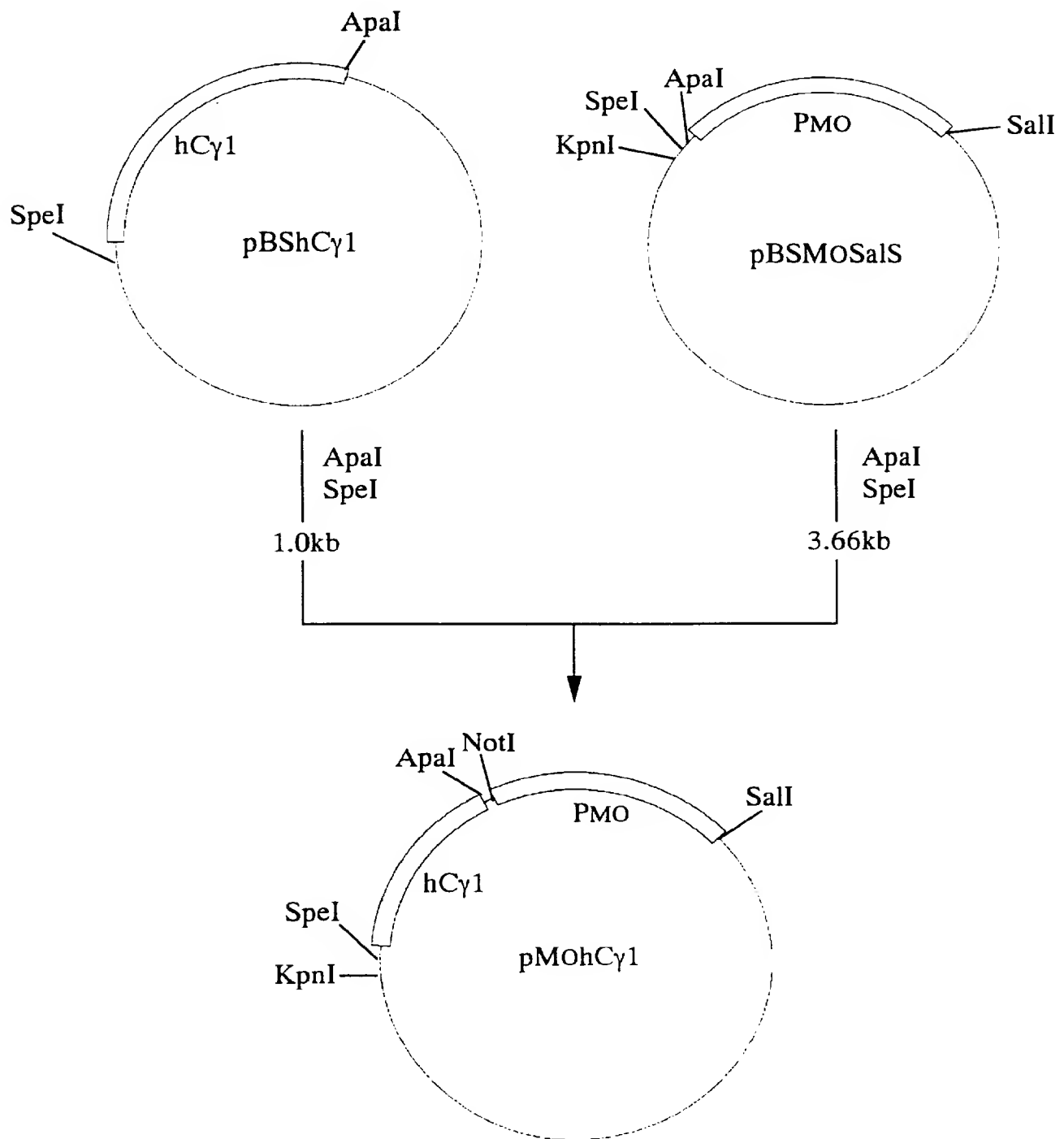
3 2 / 6 1

第 3 2 図



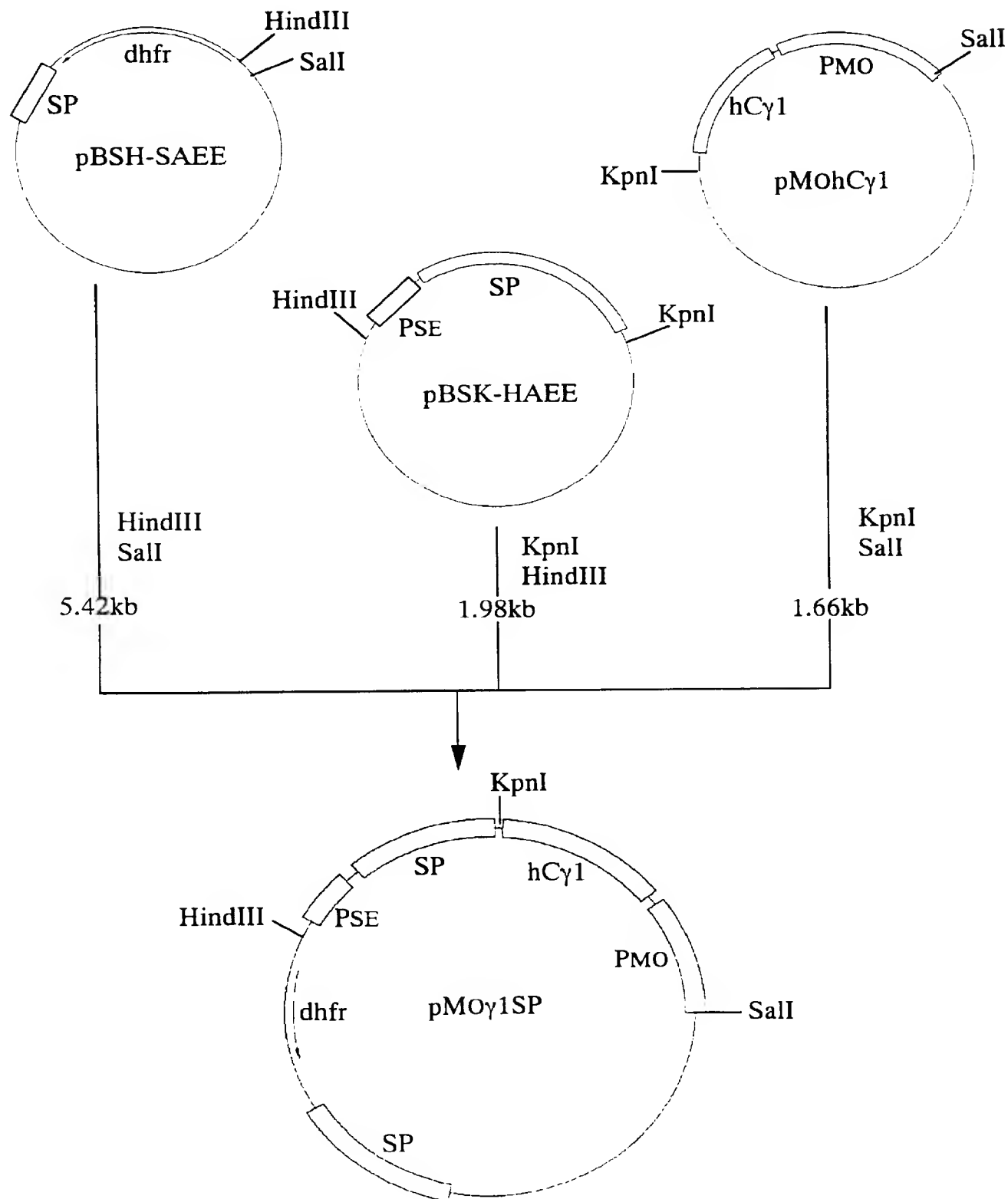
33 / 61

第 33 図



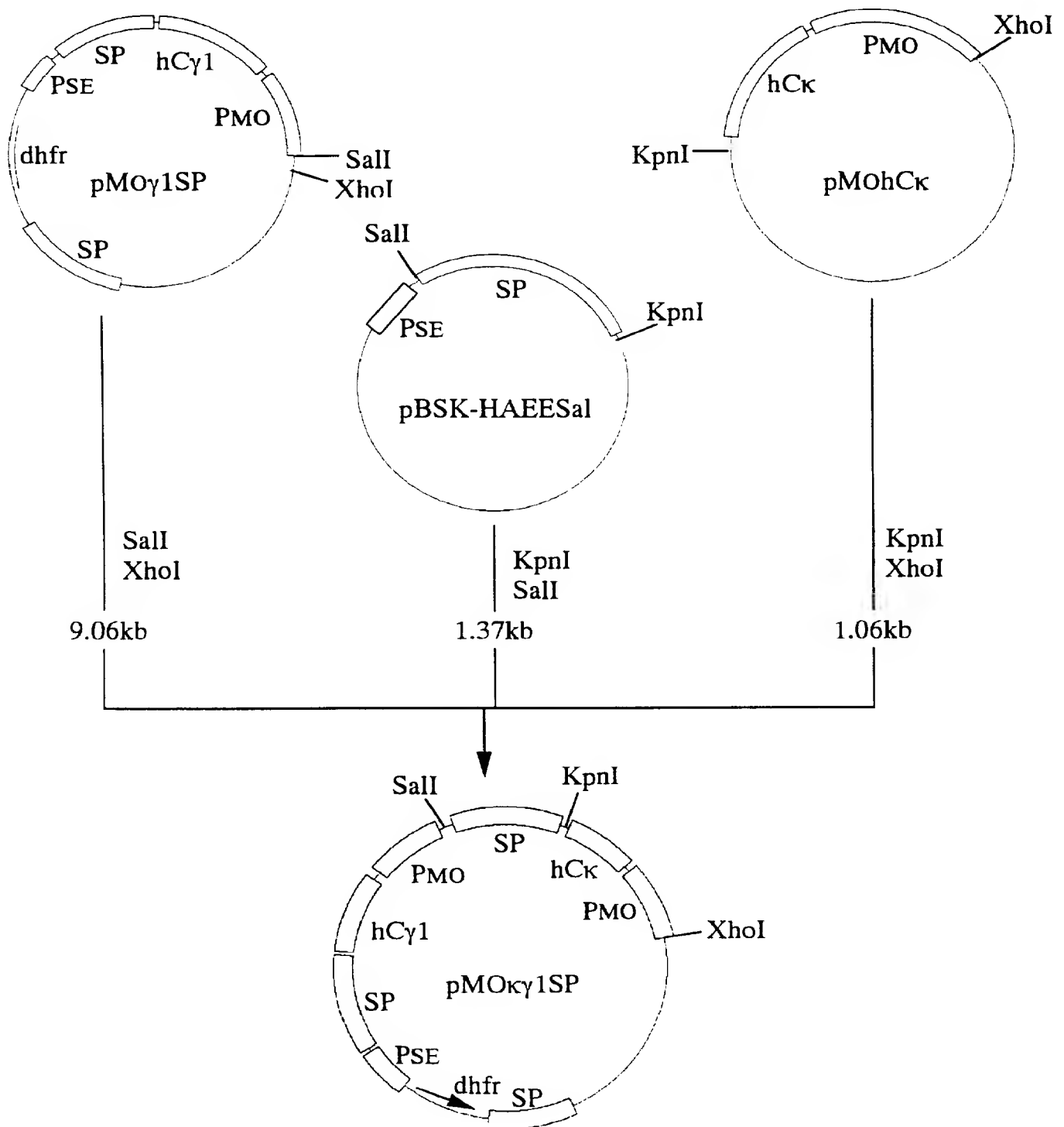
34 / 61

## 第 34 図



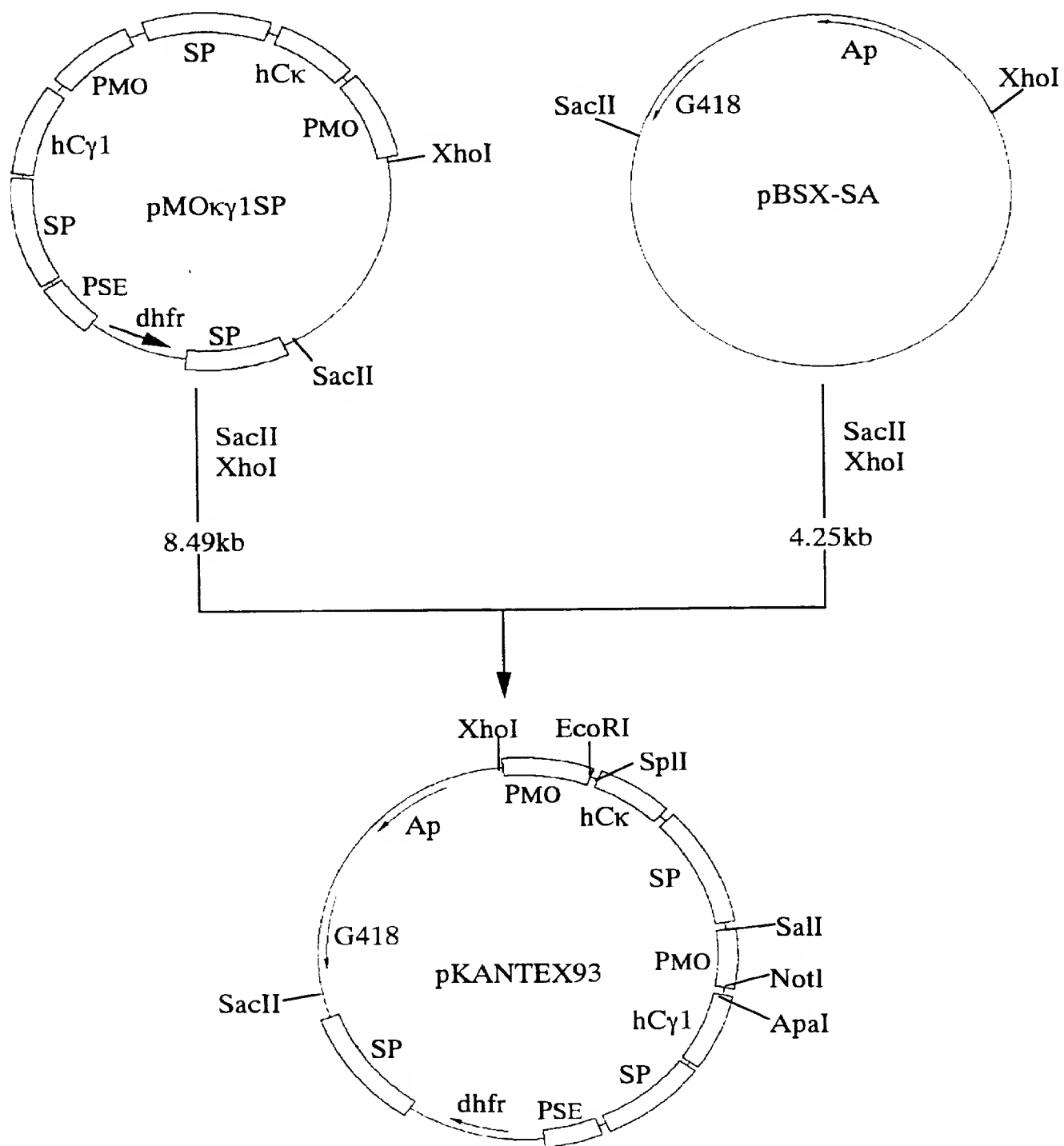
35 / 61

## 第 35 図



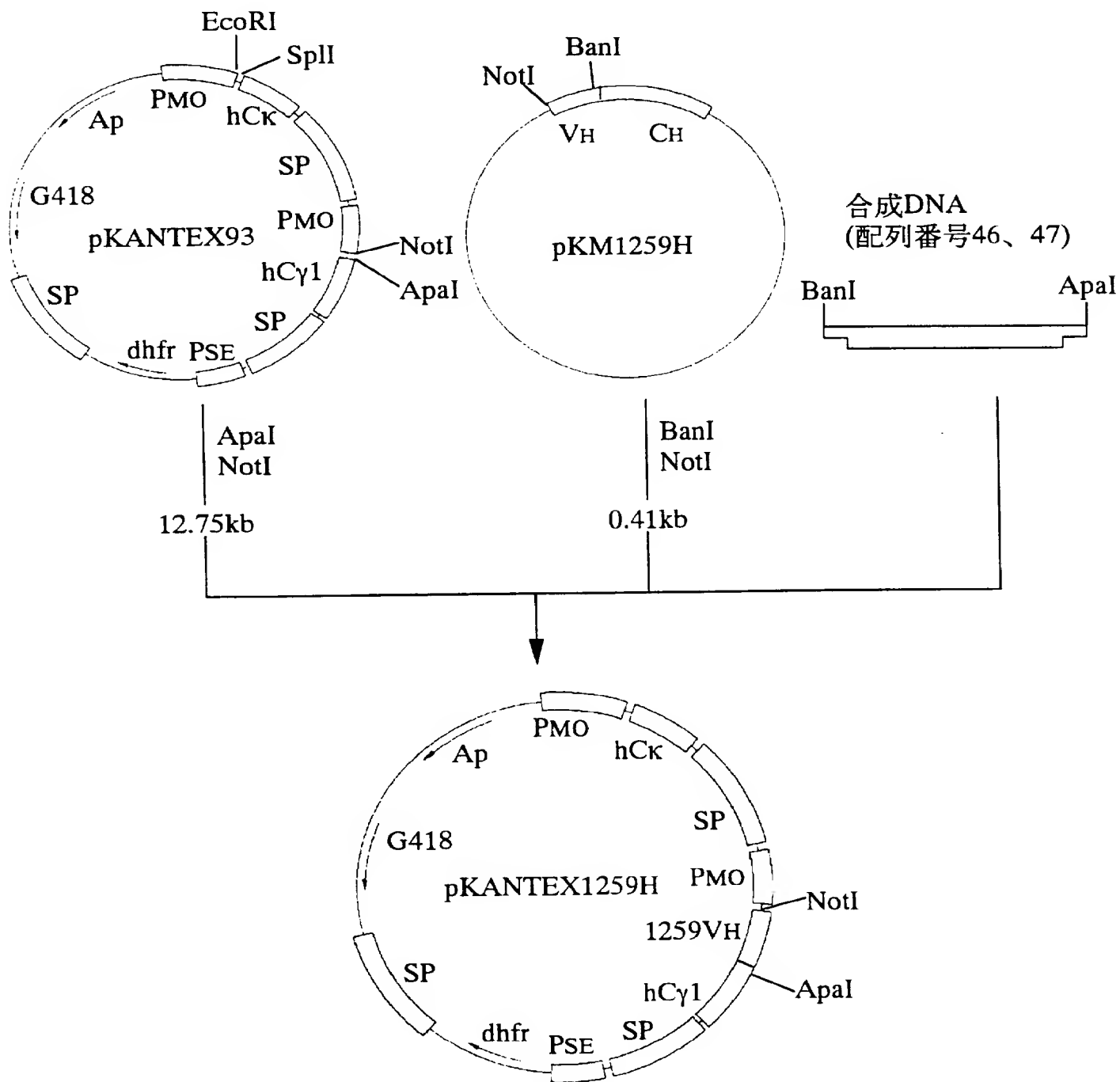
36 / 61

## 第 36 図



37 / 61

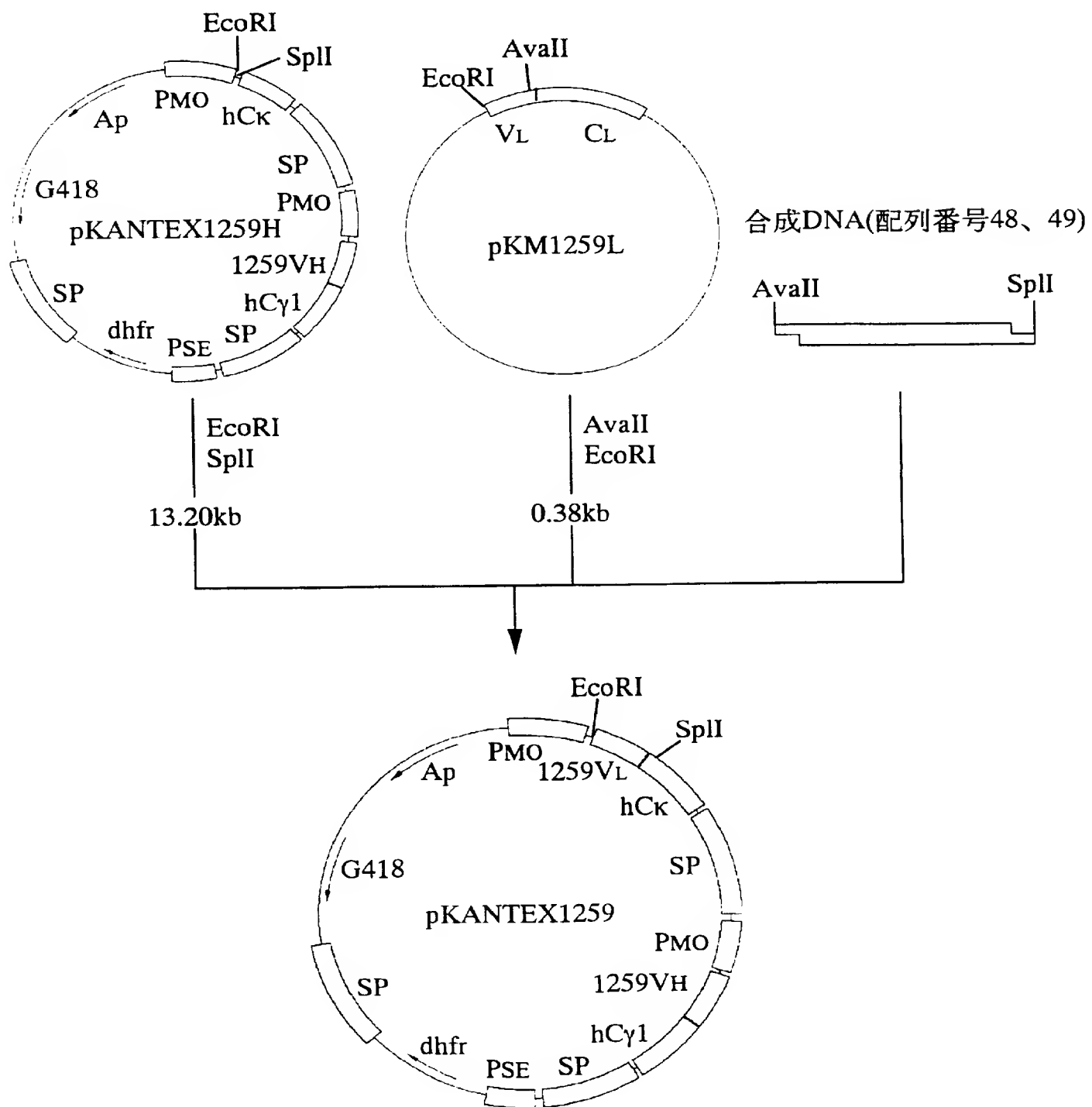
第 37 図





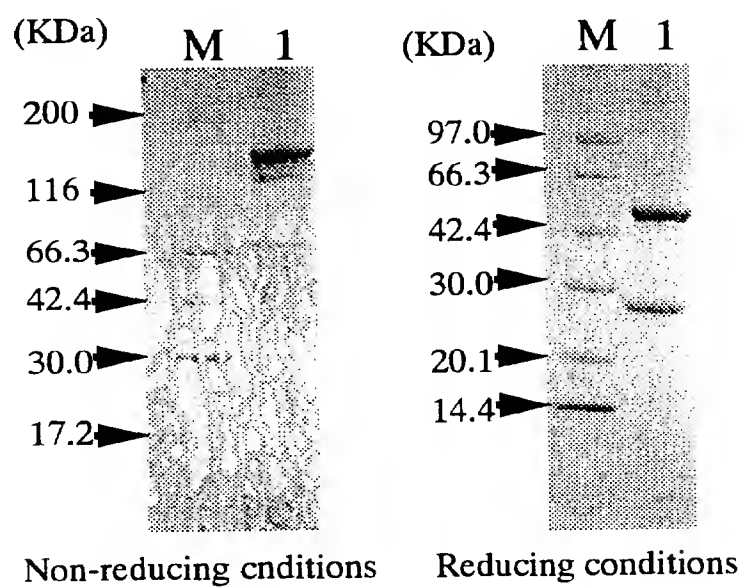
38 / 61

## 第 38 図



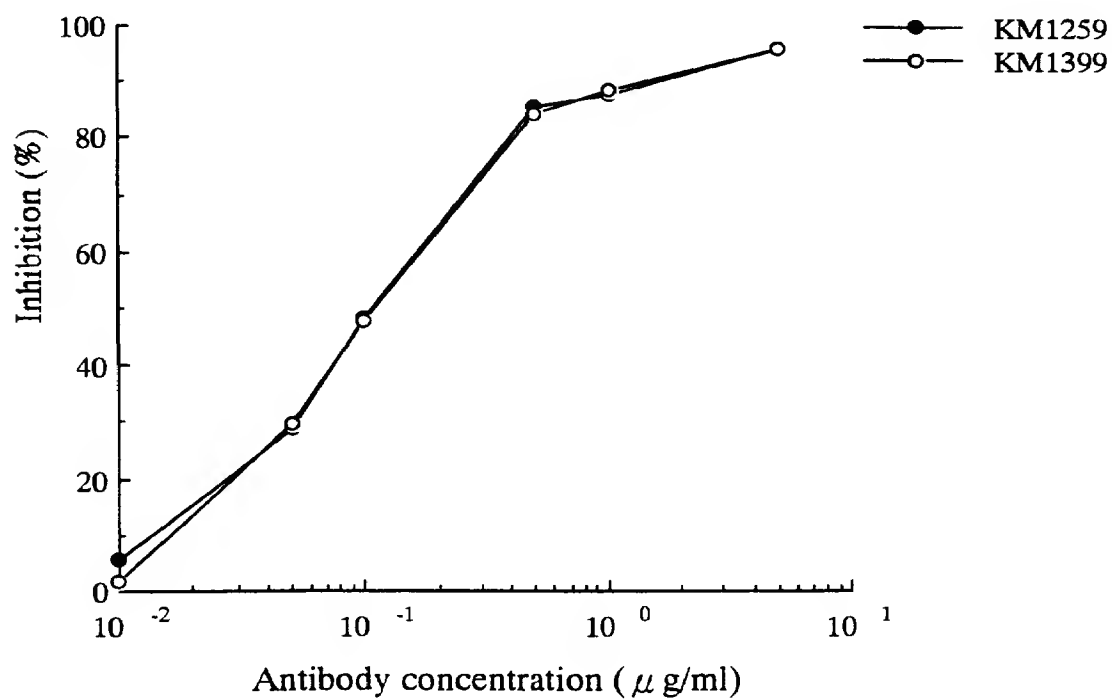
39 / 61

## 第 39 図



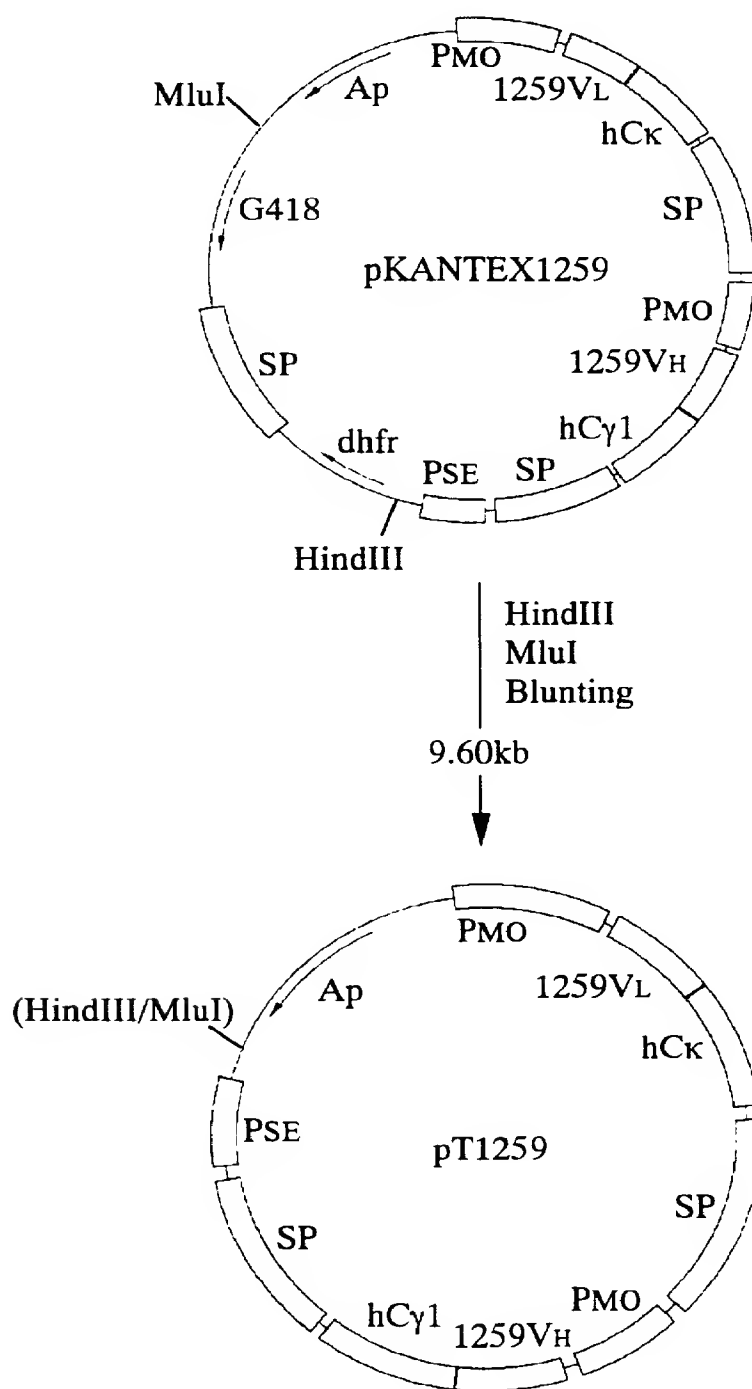
40 / 61

## 第 40 図



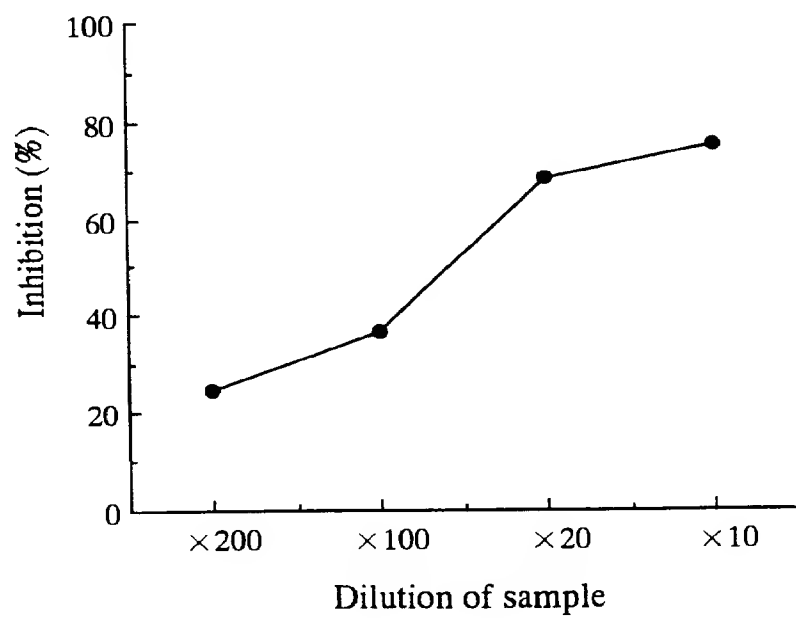
41 / 61

## 第 41 図



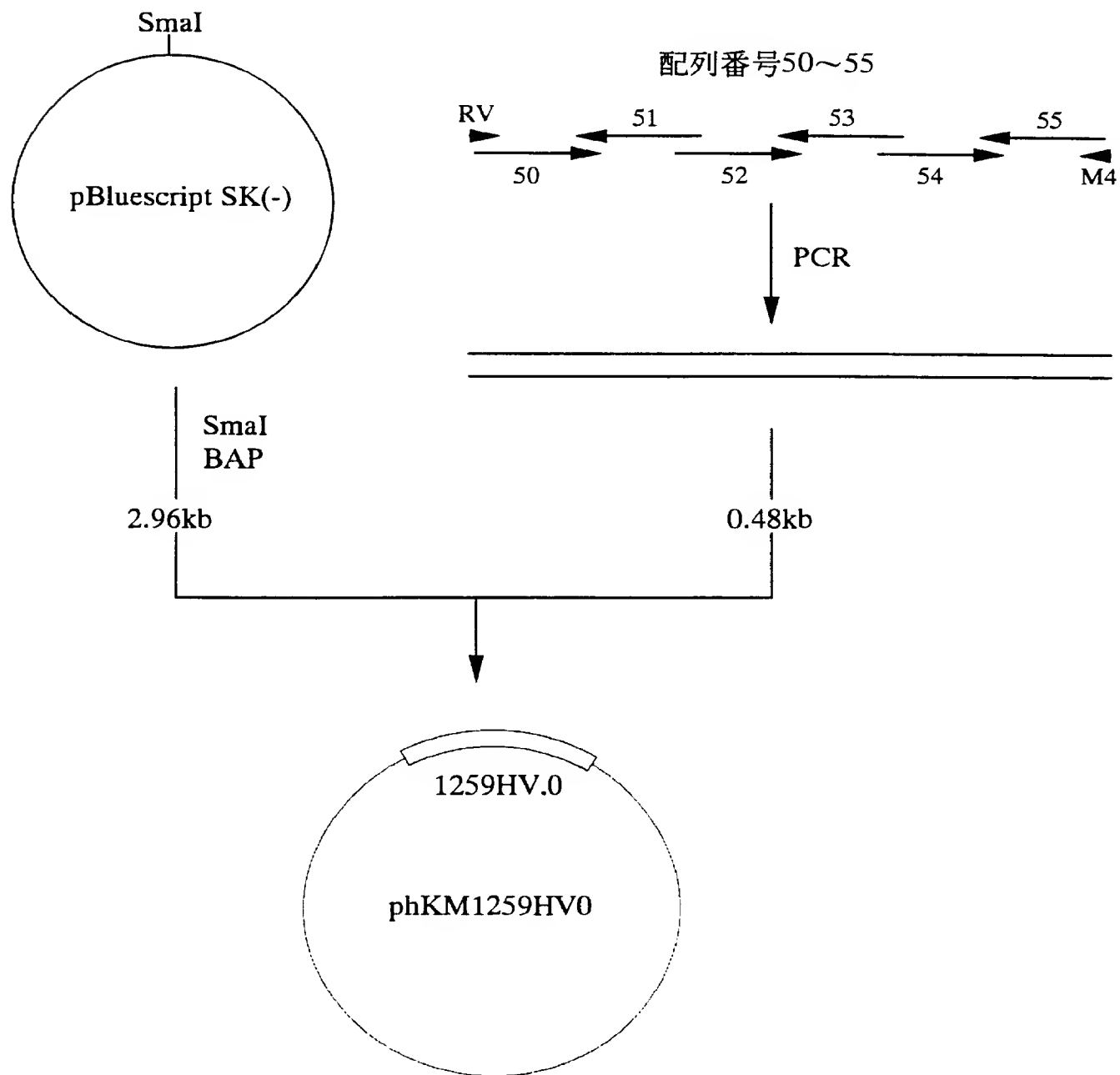
4 2 / 6 1

## 第 4 2 図



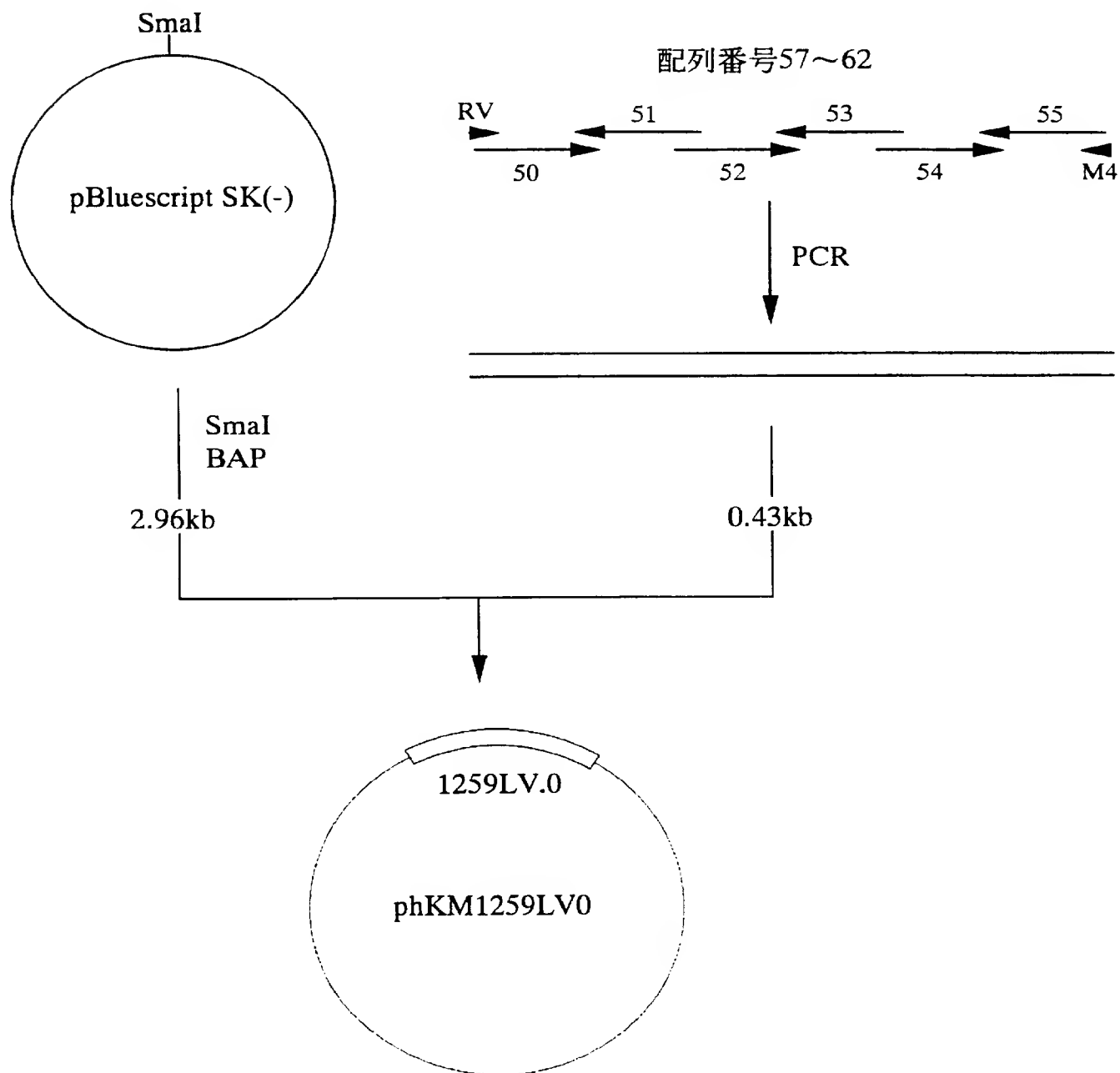
4 3 / 6 1

第 4 3 図



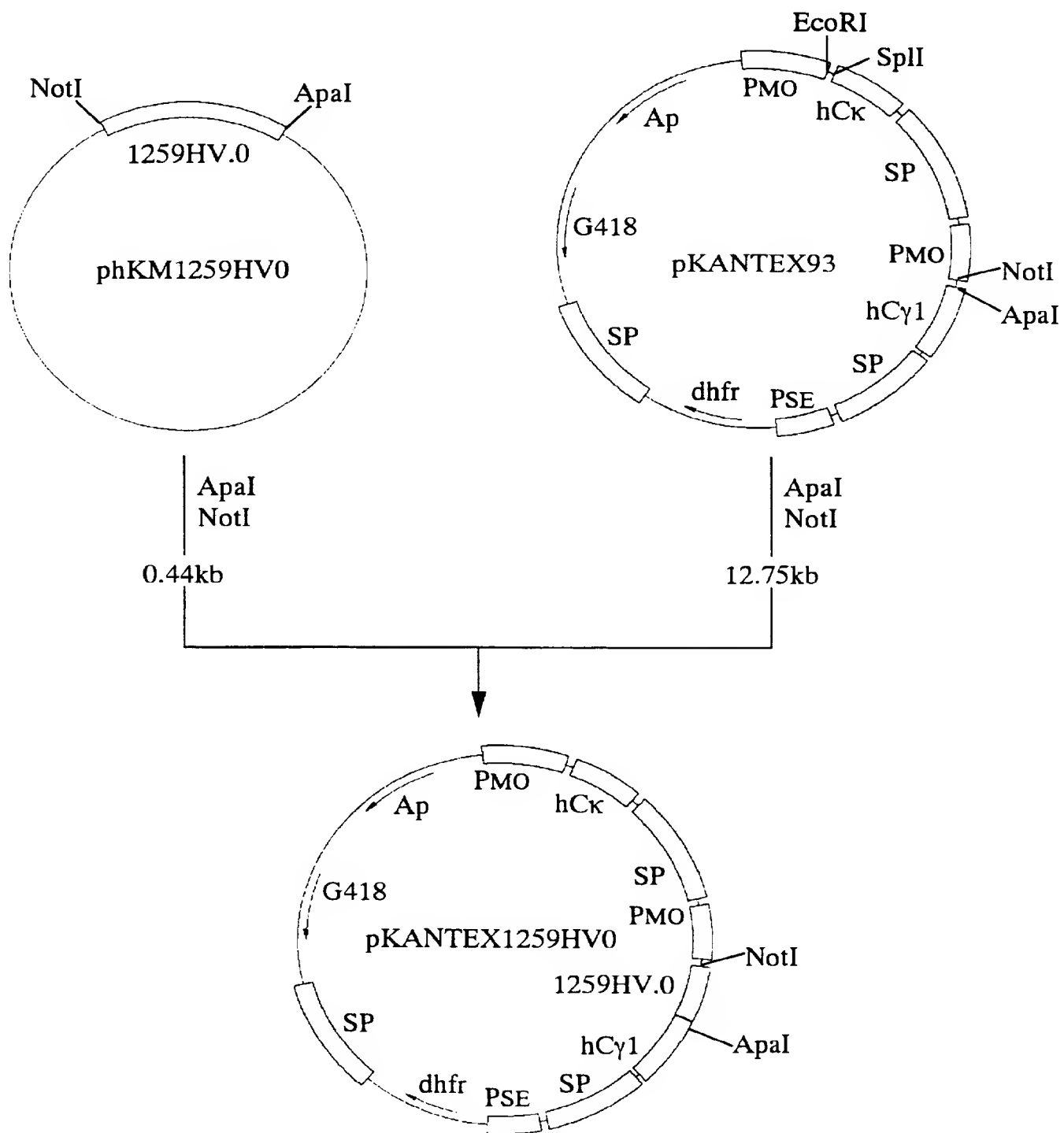
44 / 61

## 第 44 図



45 / 61

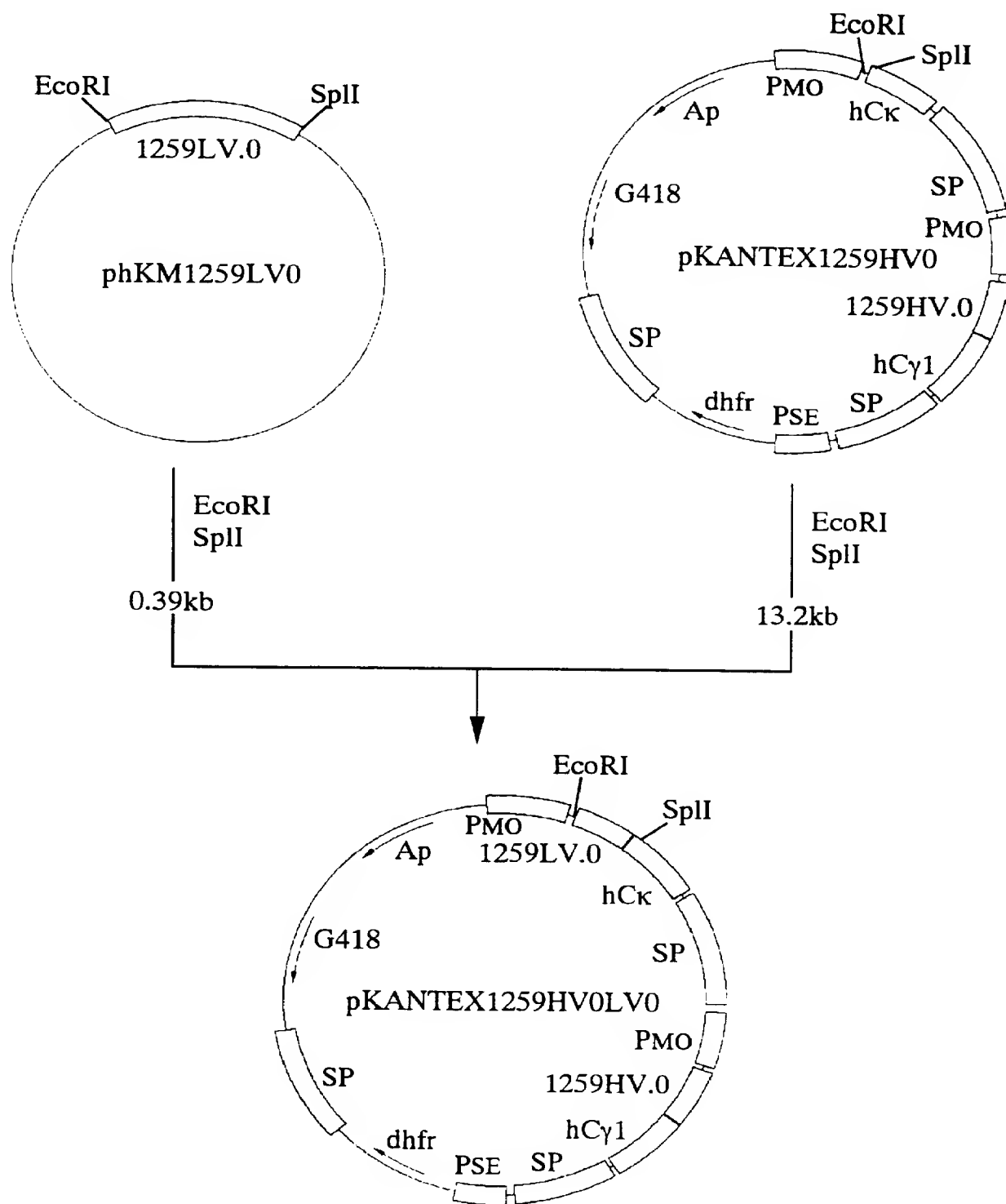
## 第 45 図





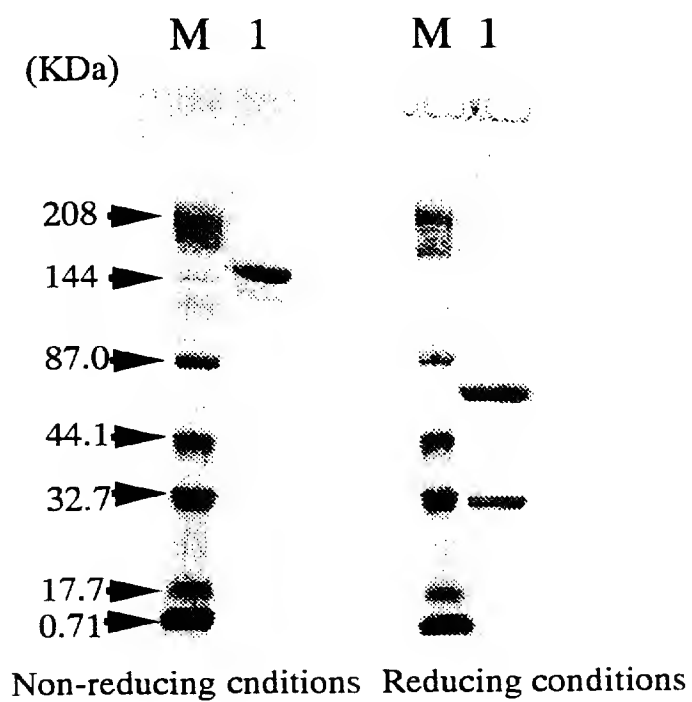
46 / 61

## 第 46 図



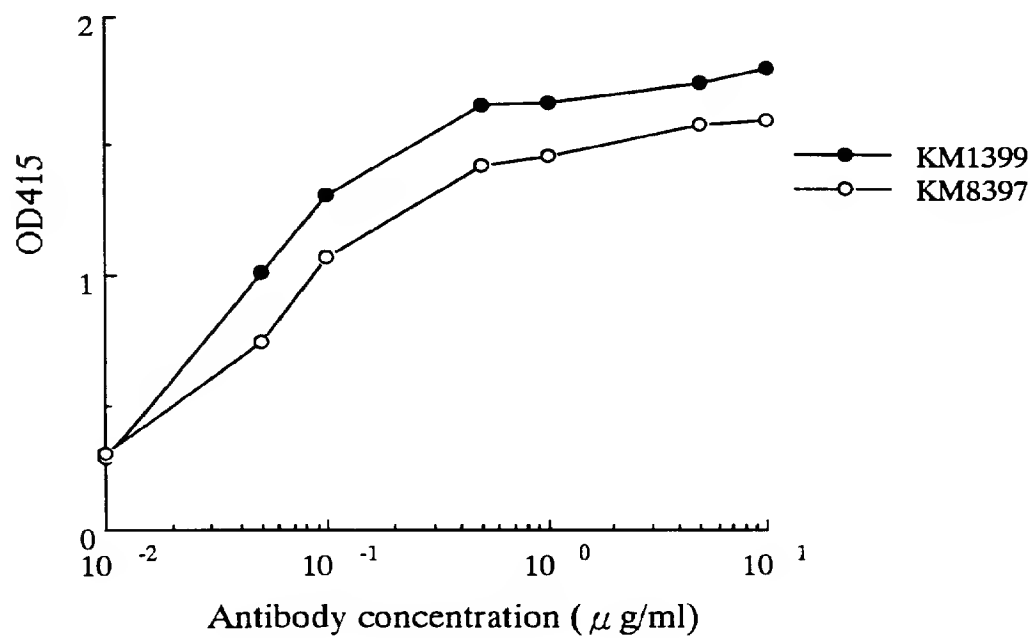
47 / 61

## 第 47 図



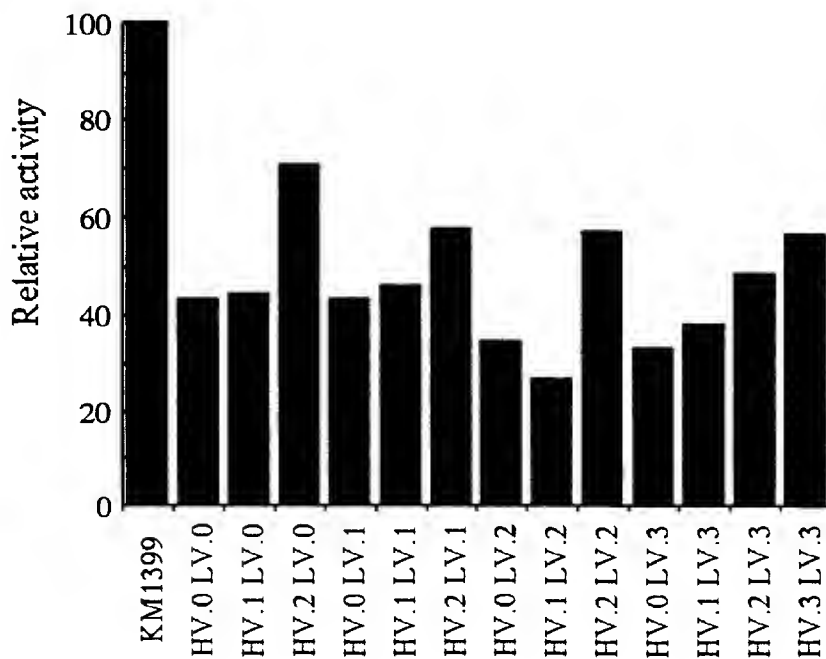
48 / 61

第 48 図



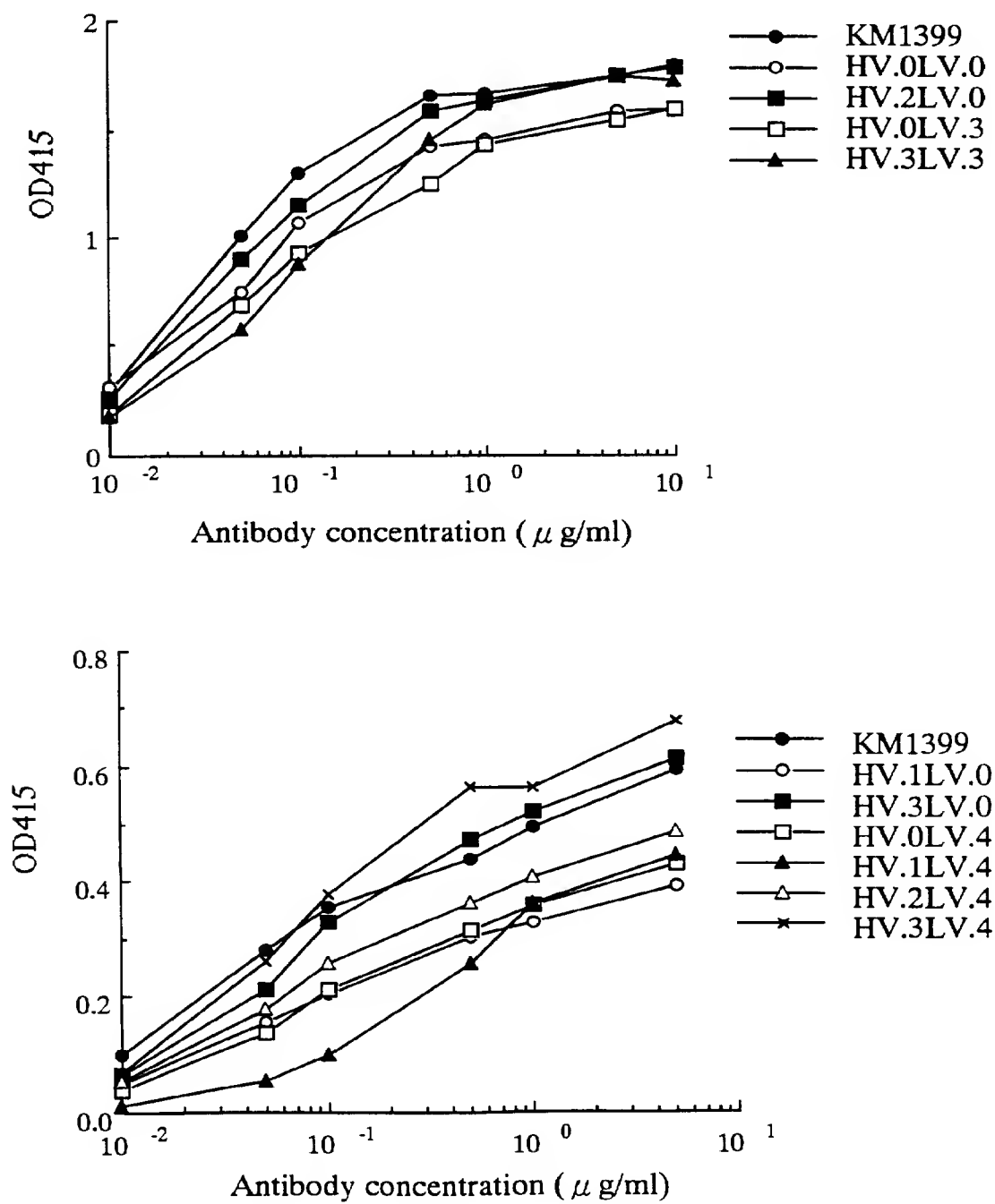
49 / 61

## 第 49 図



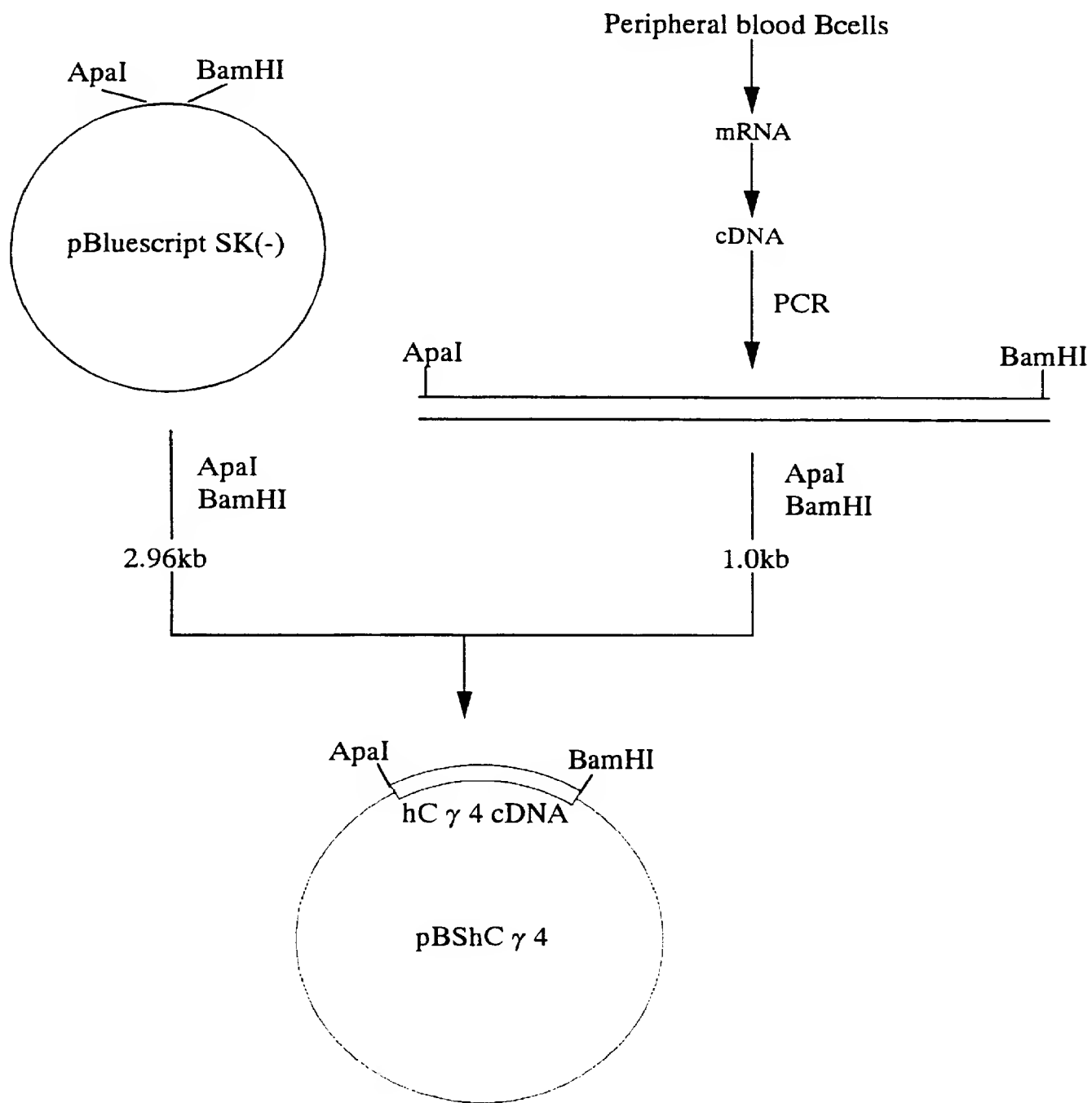
50 / 61

## 第 50 図



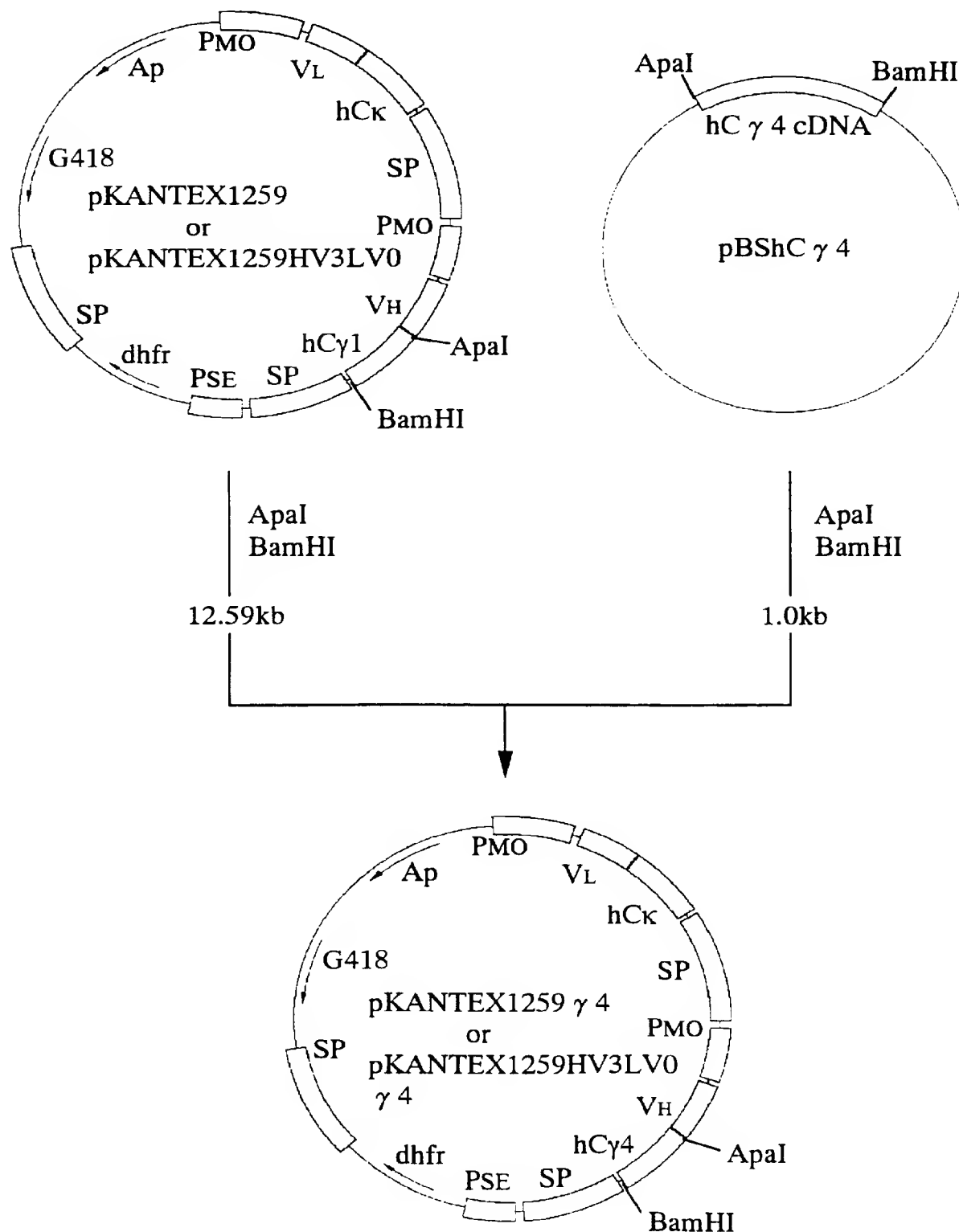
51 / 61

## 第 51 図



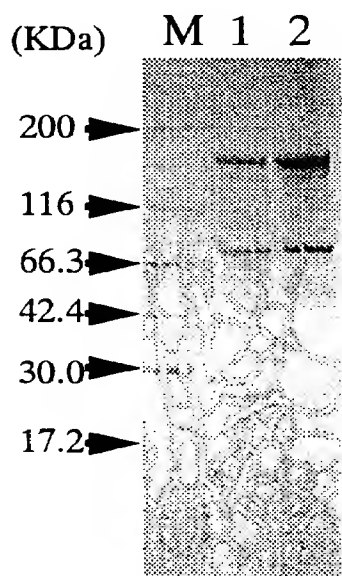
52 / 61

## 第 52 図

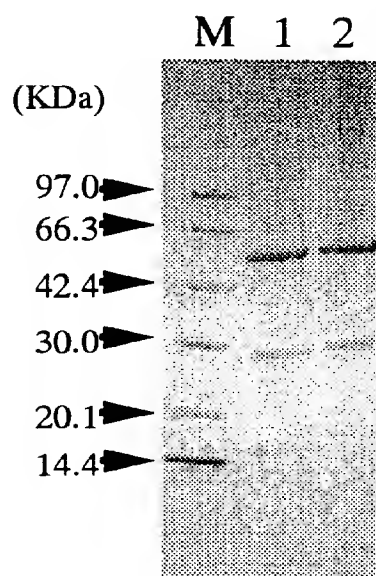


53 / 61

## 第 53 図



Non-reducing conditions

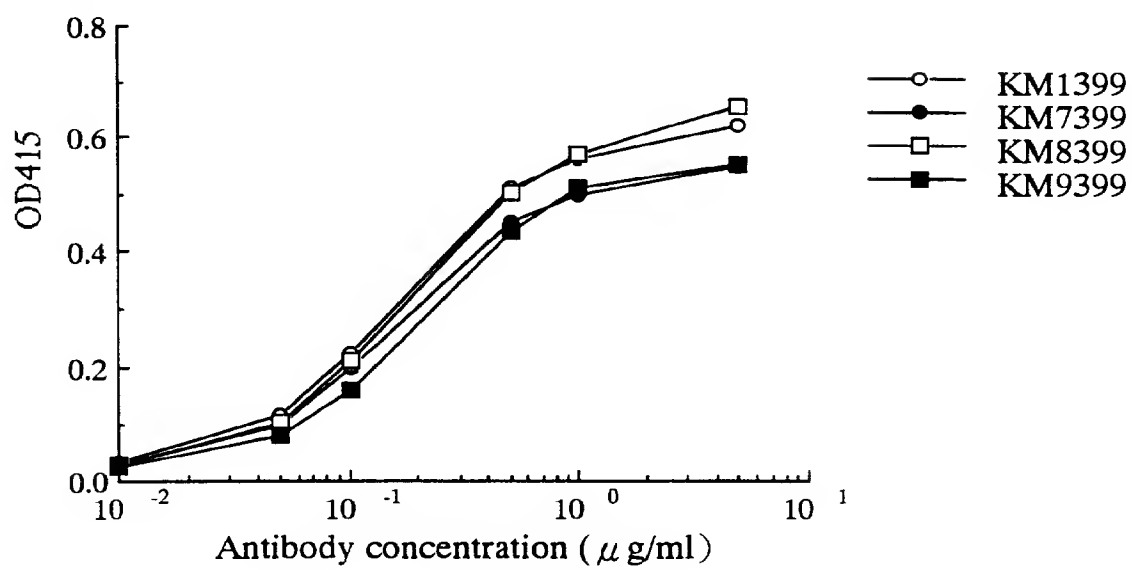


Reducing conditions



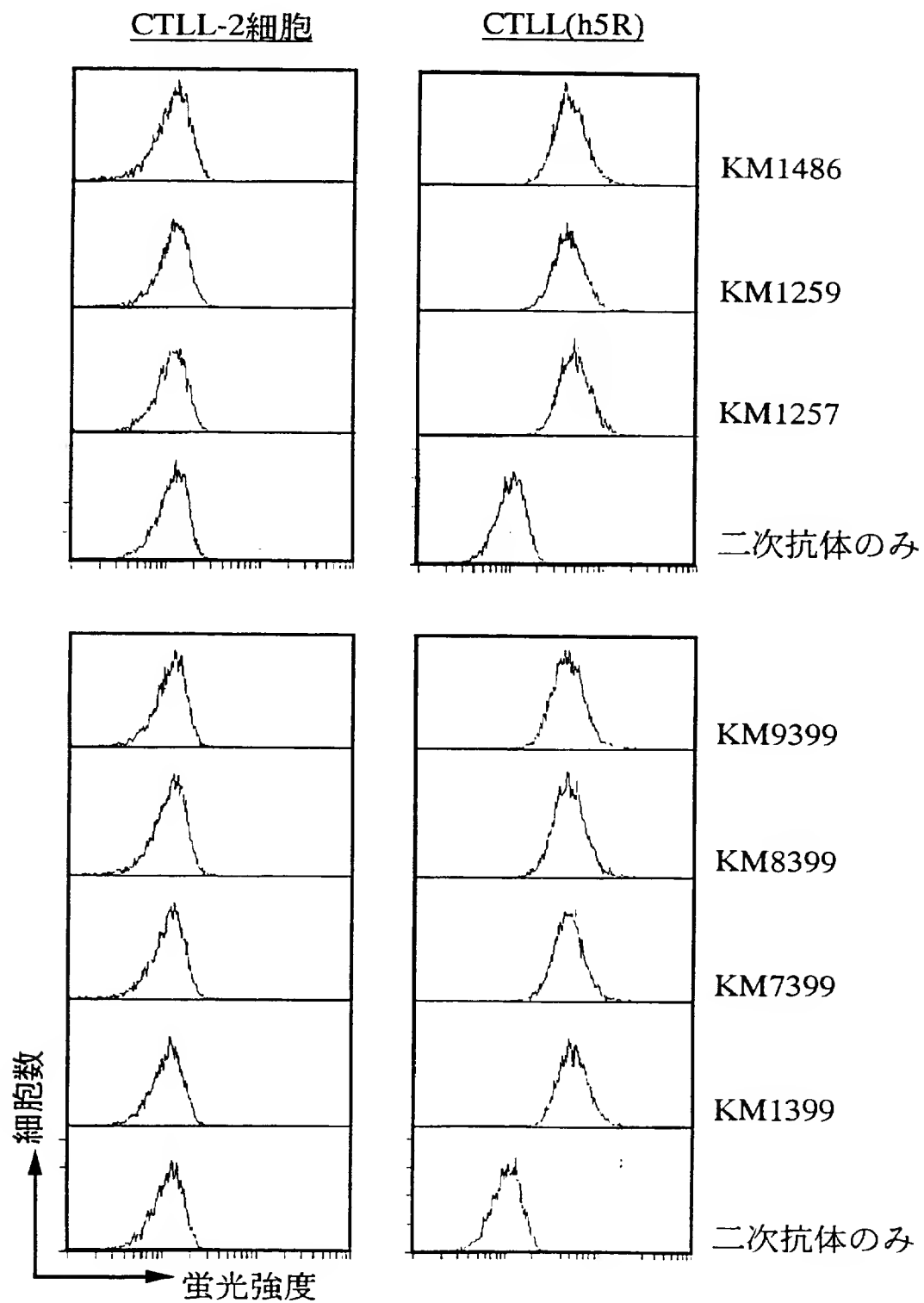
5 4 / 6 1

第 5 4 図



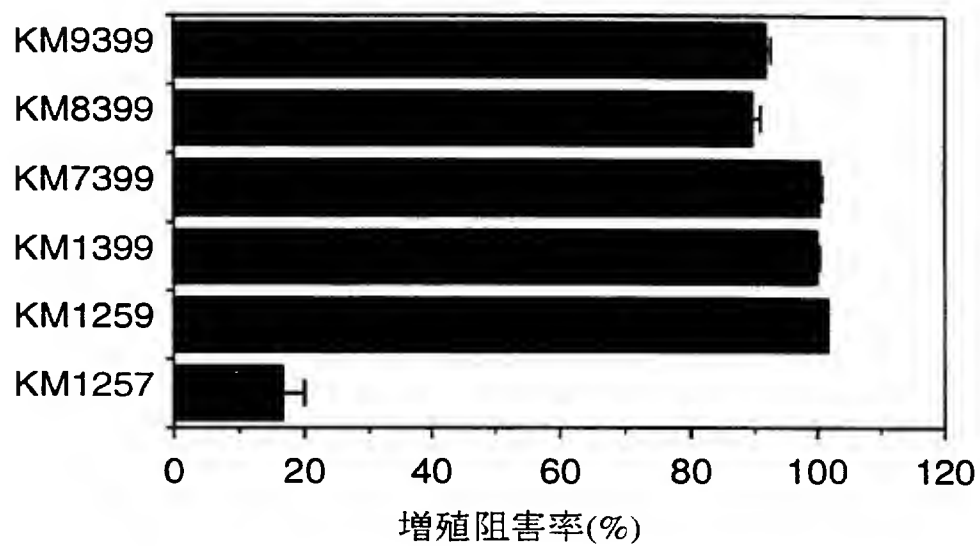
55 / 61

## 第 55 図



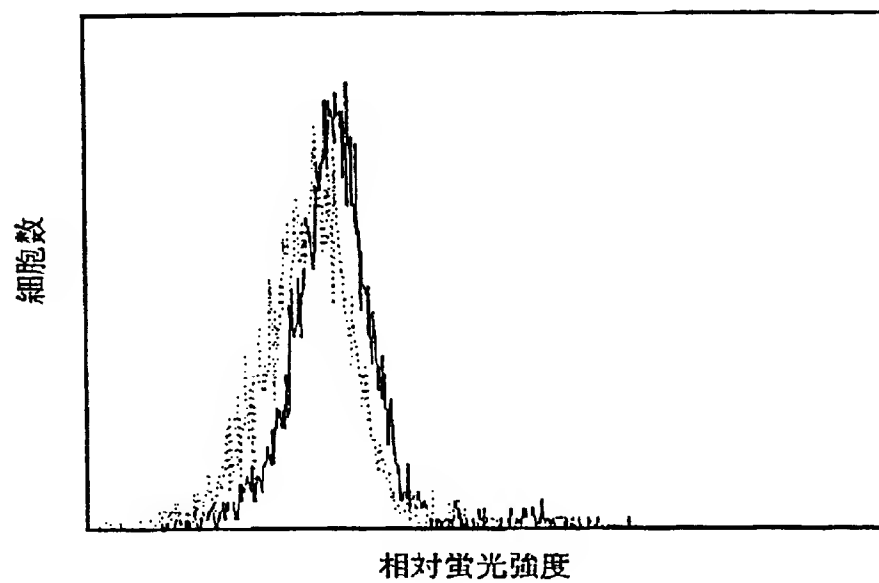
56 / 61

## 第 56 図



57/61

第 57 図

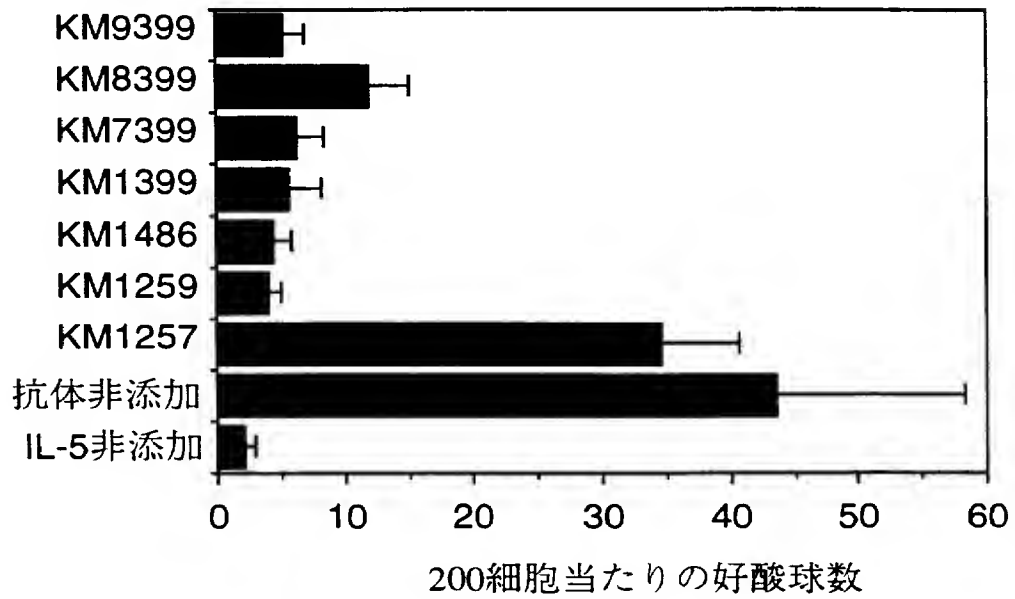


破線：対照抗体 (KM341)

実線：抗ヒトIL-5R  $\alpha$  モノクローナル抗体 (KM1259)

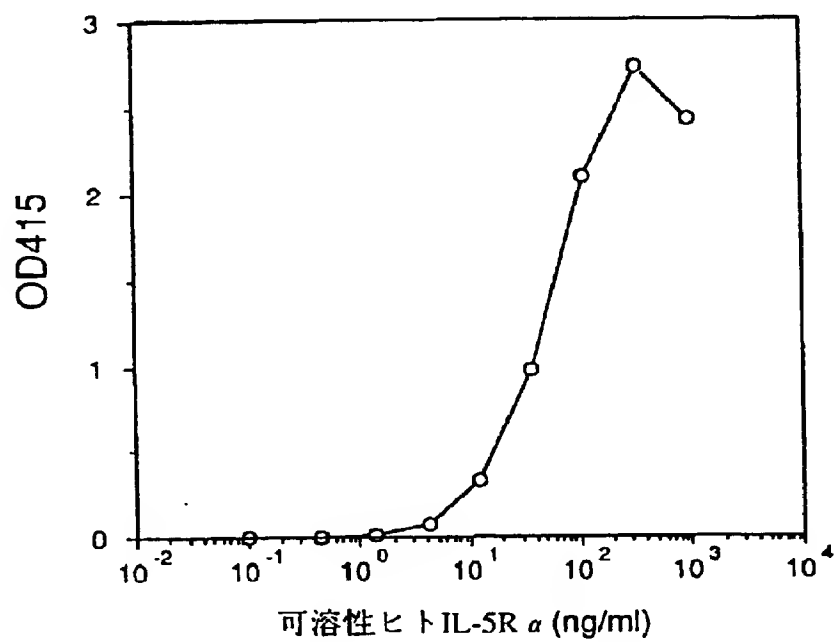
58 / 61

## 第 58 図



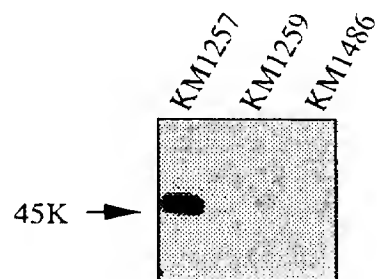
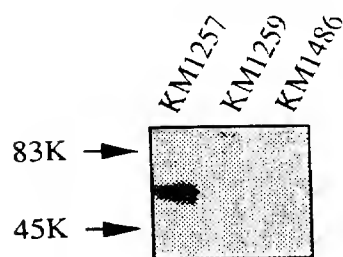
59 / 61

## 第 59 図



60 / 61

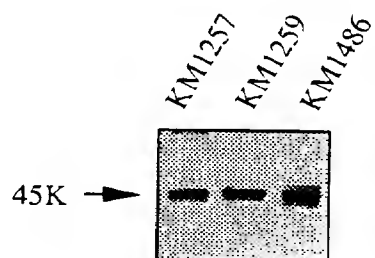
## 第 60 図

2-メルカプトエタノール非添加2-メルカプトエタノール添加

61 / 61

第 61 図

ヒトIL-5受容体 $\alpha$ 鎖の免疫沈降





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl<sup>6</sup> C12P21/08, C12N15/06, C12N15/09, C12N15/139, C12N15/63, C12N15/85, C12N5/20, C07K16/28, C07K14/715, G01N33/577, G01N33/53, A61K39/00, A61K39/395// (C12P21/08, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC C12R1:91)

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/02-15/90, C12P21/00, 21/02, 21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Sigrid Cornelis, et al., "Detailed analysis of the IL-5-IL-5R $\alpha$ interaction: characterization of crucial residues on the ligand and the receptor", EMBO. J. (July 1995) Vol. 14, No. 14, p. 3395-3402	1-3, 15, 19, 20, 27, 50-54, 57, 58
Y		4, 6, 7, 12, 16, 18, 37, 42, 47
X	H. DeFex L., et al., "Characterization of anti IL-5 receptor monoclonal antibodies using surface plasmon resonance", FASEB J. (April 1995) Vol. 9, No. 6, p. A1502	1-3, 15, 19, 20, 27, 50-54, 57, 58
Y		4, 6, 7, 12, 16, 18, 37, 42, 47
Y	Satoshi Takaki, et al., "Reconstitution of the functional receptors for murine and human	4, 6, 7, 12, 16, 18,

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 13, 1996 (13. 12. 96)

Date of mailing of the international search report

December 25, 1996 (25. 12. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02588

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	interleukin 5", J. Exp. Med. (1993) Vol. 177, No. 6, p. 1523-1529	47-49
Y	Yoshiyuki Murata, et al., "Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor", J. Exp. Med. (1992) Vol. 175, No. 2, p. 341-351	4, 6, 7, 12, 16, 18, 47-49
Y	Robert E. Bird, et al., "Single-chain antigen-binding proteins", Science (1988) Vol. 242, p. 423-426	37
Y	Keith O. Webber, et al., "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog", Molecular Immunology (1995) Vol. 32, No. 4, p. 249-258	42
Y	Keith O. Webber, et al., "Rapid and specific uptake of anti-Tac disulfide-stabilized Fv by interleukin-2 receptor-bearing tumors", Cancer Research (January 1995) Vol. 55, No. 2, p. 318-323	37, 42
A	M. Korenaga, et al., "The role of interleukin-5 in protective immunity to strongyloides venezueles infection in mice", Immunology (1991) Vol. 72, No. 4, p. 502-507	5, 8-11, 13, 14, 17, 21-26, 28-34, 38-41, 43-46
A	JP, 2-257891, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), October 18, 1990 (18. 10. 90) (Family: none)	35, 36

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02588

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 55, 56  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as claimed in the above claims pertain to  
methods for treatment of the human or animal body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such  
an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all  
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment  
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report  
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is  
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 96/02588

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

C12P 21/08, C12N 15/06, C12N 15/09, C12N 15/139, C12N 15/63, C12N 15/85, C12N 5/20, C07K 16/28,  
Int. Cl<sup>6</sup> C07K 14/715, G01N 33/577, G01N 33/53, A61K 39/00, A61K 39/395  
// (C12P 21/08, C12R 1:91)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/02 - 15/90, C12P 21/00, 21/02, 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Sigrid Cornelis, et al. "Detailed analysis of the IL-5-IL-5R $\alpha$ interaction: characterization of crucial residues on the ligand and the receptor", EMBO. J. (7月.1995) 第14巻, 第14号, p. 3395-3402	1-3, 15, 19, 20, 27, 50-54, 57, 58
Y		4, 6, 7, 12, 16, 18, 37, 42, 47

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.12.96

国際調査報告の発送日

25.12.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植野 浩志

印

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	H. DeFex L., et al. "Characterization of anti IL-5 receptor monoclonal antibodies using surface plasmon resonance", FASEB J. (4月. 1995) 第9巻, 第6号, p. A1502	1-3, 15, 19, 20, 27, 50-54, 57, 58
Y		4, 6, 7, 12, 16, 18, 37, 42, 47
Y	Satoshi Takaki, et al. "Reconstitution of the functional receptors for murine and human interleukin 5", J. Exp. Med. (1993) 第177巻, 第6号, p. 1523-1529	4, 6, 7, 12, 16, 18, 47-49
Y	Yoshiyuki Murata, et al. "Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor", J. Exp. Med. (1992) 第175巻, 第2号, p. 341-351	4, 6, 7, 12, 16, 18, 47-49
Y	Robert E. Bird, et al. "Single-chain antigen-binding proteins", Science (1988) 第242巻, p. 423-426	37
Y	Keith O. Webber, et al. "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog", Molecular Immunology (1995) 第32巻, 第4号, p. 249-258	42
Y	Keith O. Webber, et al. "Rapid and specific uptake of anti-Tac disulfide-stabilized Fv by interleukin-2 receptor-bearing tumors", Cancer Research (1月, 1995) 第55巻, 第2号, p. 318-323	37, 42
A	M. Korenaga, et al. "The role of interleukin-5 in protective immunity to strongyloides venezuelensis infection in mice", Immunology (1991) 第72巻, 第4号, p. 502-507	5, 8-11, 13, 14, 17, 21-26, 28-34, 38-41, 43-46
A	J P, 2-257891, A (協和醗酵工業株式会社) 18日. 10月. 1990 (18. 10. 1990) ファミリーなし	35, 36

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 55、56 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
上述の請求の範囲に記載された発明は、人又は動物の身体の治療方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。